Archive of SID

بررسی اثرات عصاره چای سیاه (*Comellia sinensis*) بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاه(*in vitro*)

مریم ارشاد لنگرودی[1*]، **مطهره ارشاد لنگرودی**[2]

1- کارشناس ارشد زیست شناسی- میکروبیولوژی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

2- دانشجوی دکترای علوم باغبانی- گرایش گیاهان زینتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران

Email: maryam_ershad@yahoo.com

چکیده:

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت های پوستی، بافت های نرم و عفونت های تهاجمی است که از بیمارستان یا جامعه کسب می شوند. امروزه آنتی بیوتیک‌ها به عنوان درمان کننده اصلی عفونت‌های باکتریایی هستند ولی به دلیل افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها و وجود عوارض جانبی آنها، استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان روش کمکی درمان مورد توجه محققان قرار گرفته است. اثرات ضد باکتریایی انواع چای و پلی فنل های خالص آن به اثبات رسیده است، همچنین اثر سینرژیک چای با آنتی بیوتک‌ها گزارش شده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر مهاری غلظت های مختلف عصاره چای سیاه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با آنتی بیو تیک های استاندارد می باشد. در این پژوهش عصاره چای سیاه به روش پرکولاسیون، تهیه و خشک شد سپس در دو غلظت 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر تهیه گردید. باکتری‌ها به روش Pour plate و با استفاده از غلظت های مختلف عصاره چای سیاه و تست آنتی بیوگرام توسط دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک که شامل سیپروفلوکساسین، سفازولین و ونکومایسین بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. داده ها به کمک آزمون‌های آماری و تجزیه واریانس مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره چای سیاه بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اثر مهار کنندگی وابسته به دوز دارد. همچنین بررسی ها نشان داد که عصاره چای در غلظت 100 mg/ml بیشترین اثر مهارکنندگی را دارد که این اثر مهارکنندگی بیشتر از دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه بوده است.

واژگان کلیدی: عصاره چای سیاه، استافیلوکوکوس اورئوس، آنتی بیوگرام، اثر مهاری

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

گیاه چای با نام علمی (*Comellia sinensis*) است که از دم کردن برگهای جوان، جوانه ها یا شاخه های فرآوری شده به مدت چند دقیقه در آب جوش نوشیدنی به دست می آید که یکی از رایجترین و مهمترین نوشیدنی های پرمصرف جهان است (Nataro ,2006). چای نوشیدنی پرطرفداری است که در کشورهایی مانند چین، ژاپن و بعضی دیگر از کشورهای شرق آسیا و هند به صورت چای سیاه مصرف می شود(شعاع حسنی و همکاران، 1387). کشت چای در ایران از سال 1319 هجری توسط کاشف السلطنه در شهرستان لاهیجان عملی شد. تولید سالیانه چای در استان گیلان به عنوان اصلی ترین ناحیه تولید چای ایران با بیش از 34 هزار هکتار زمین های کشاورزی چای در حدود 61000 تن است(ارض پیما، 1378) . چای یک منبع طبیعی از کافئین، تئوفیلین، تیانین و آنتی اکسیدان هاست ،کاتکین نوعی آنتی اکسیدان است که در این گیاه موجود است. مصرف چای باعث تسریع حرکات تنفسی، تسریع گردش خون، احساس تجدید نیرو ، گوارش بهتر، تعریق و غیره می‌شود(معمار زاده و همکاران، 1391).

استافیلوکوکوس اورئوس، یک باکتری گرم مثبت است که در پوست رشد و نمو می کند و در قسمت ابتدایی بینی 25 تا 30 درصد افراد بدون نشانه‌های بالینی مشخص وجود دارد و به عنوان مهمترین مخازن گسترش آلودگی شناخته می شود(Grundmann *et al*, 2006). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری است که بر روی غشاهای پوست و مخاطی پستانداران، مواد غذایی و محیط یافت می گردد و عامل ایجاد کننده ذات‌الریه بعد از عفونت‌های ویروسی است همچنین باعث ایجاد التهاب وریدها، مننژیت، عفونت دستگاه مجاری ادارای، التهاب موضعی استخوانها، ضایعات سطحی پوست و غیره می باشد(Turkyilmaz *et al* ,2006) . استافیلوکوکوس اورئوس در بین سایر باکتری‌ها یکی از مهمترین پاتوژن‌هایی است که باعث مسمومیت غذایی شده و هرساله شمار زیادی از مردم را به این بیماری مبتلا می کند(El-Ghodban *et al* ,2006 ، Adwan *et al*, 2005).

استفاده از آنتی بیوتیک ها هسته اصلی درمان در عفونت های باکتریایی را تشکیل می دهد ولی به دلیل افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریها و وجود عوارض جانبی داروها، کاربرد یک روش کمکی برای درمان این عفونت ها اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان کمکی عفونت‌های میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است(خلجی و همکاران، 1385).

مواد و روش ها:

تهیه عصاره چای:

برای تهیه عصاره به روش پرکولاسیون، صدگرم چای سیاه به یک ارلن مایر منتقل و دو لیتر اتانول 70% به آن اضافه گردید. پس از 48 ساعت انکوباسیون در 60 درجه سانتیگراد، عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس تفاله فشرده شده تا عصاره کاملا خارج گردد. با افزودن اتانول به تفاله مراحل قبل تکرار شد. سپس با استفاده از دستگاه تبخیر کننده عصاره (تبخیر درخلاء) عصاره تغلیظ و حجم آن ml 20 رسانده شد. عصاره تغلیظ شده با انکوباسیون در50 درجه سانتیگراد کاملا خشک و سپس با کاردک تراشیده و در هاون سائیده شد. از عصاره خشک، محلول 250 mg/ml در دی متیل سولفوکسید (DMSO) تهیه شد.

در این پژوهش از سویه های خالص باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با ATCC: 29213 استفاده شده است. آزمون حساسیت باکتریایی با دو روش Pour plate و Disk diffiusion در برابر غلظت‌های مختلف عصاره چای مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش *Pour plate* :

در این روش غلظت های مختلف عصاره چای سیاه 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر در محیط تیوگلیکولات تهیه شد(حجم نهایی 10ml) سپس 1ml از سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد 0/5 مک فارلند به غلظتهای تهیه شده از عصاره های چای افزوده ودر 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از گذشت 1، 2، 3، 5، 7 و 24 ساعت یک میلی لیتر از این لوله ها به پلیت استریل منتقل گردید و 10ml ازمحیط آگار مغذی ذوب شده در 45 درجه سانتیگراد اضافه شد. پس از پخش یکنواخت باکتری در محیط همه پلیت ها در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد و نتایج رشد یا عدم رشد باکتری روی محیط کشت پس از گذشت 24 ساعت قرائت شد.

روش *Disk diffusion* :

برای تهیه دیسک عصاره چای سیاه مقدار 25 میکرولیتراز غلظت های 50 و 100 میلی گرم در میلی لیتر عصاره چای سیاه به دیسک های بلانک تلقیح شد. جهت خشک شدن دیسک ها به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از تهیه دیسک های عصاره چای سیاه با استفاده از غلظت های 50 و 100 میلی گرم در میلی لیتر، نمونه باکتری های مورد مطالعه روی محیط کشت با سواب استریل به صورت چمنی کشت داده شد و از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد و دیسک‌های عصاره چای سیاه و دیسک‌های استاندارد آنتی بیوتیک شامل ونکومایسین (5میکروگرم)، سفازولین (30میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5میکروگرم) جداگانه روی محیط کشت قرار داده شد سپس پلیت ها داخل انکوباتور در 37 درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از 18 ساعت نتایج حاصل قرائت گردید. قطر

www.SID.ir

Archive of SID

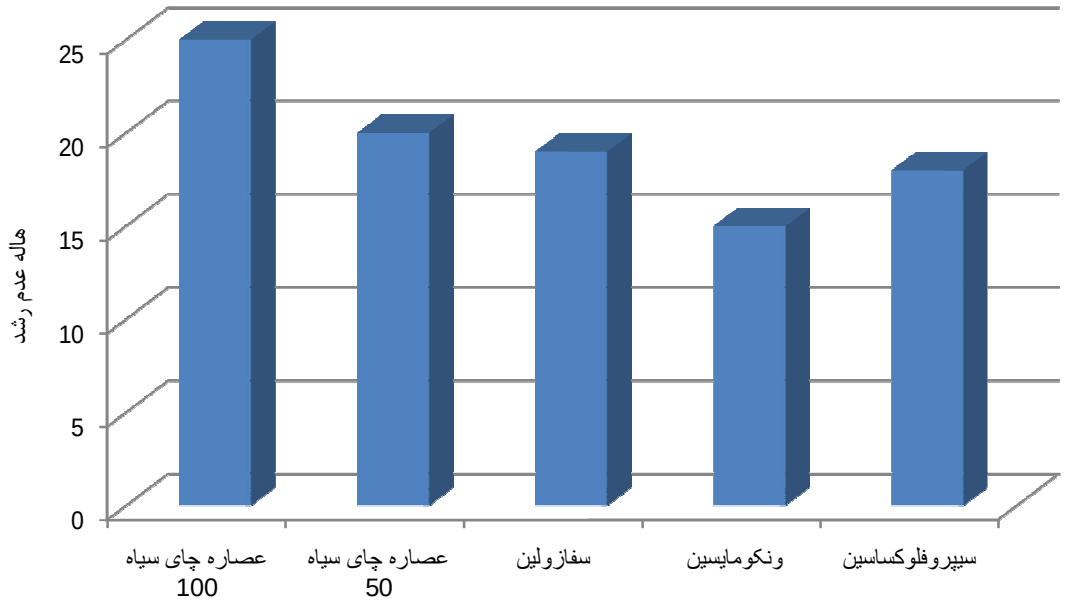
هاله عدم رشد در اطراف دیسک های حاوی عصاره چای و دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک بر حسب میلی متر به وسیله خط کش اندازه گیری و ثبت شد و مورد آنالیز آماری قرار گرفت. آزمون های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS14 انجام شد.

نتایج:

نتایج به دست آمده از روش Pour plate نشان داد با افزایش غلظت عصاره چای سیاه رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس کاهش می یابد(P>0/05). آزمون آنتی بیوگرام به روش دیسک برای دیسک های استاندارد 8 بار انجام شد. سپس از روی قطر هاله‌های مهار رشد محاسبه و برای آنالیز آماری استفاده شد.

همچنین تجزیه واریانس بین میانگین قطر هاله های عدم رشد آنتی بیوتیک های استاندارد سیپروفلوکساسین، سفازولین و وانکومایسین با دو غلظت مختلف عصاره چای سیاه اختلاف معنی دار را نشان می دهد(P>0/05).

نتایج داده ها نشان داد که عصاره چای سیاه با غلظت 100 mg/ml بیشترین تاثیر را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با آنتی بیوتیک های استاندارد داشته است(نمودار 1). همچنین مقایسه نتایج داده ها نشان داد که عصاره چای سیاه با غلظت 50 mg/ml با آنتی بیوتیک های استاندارد سیپروفلوکساسین، سفازولین و ونکومایسین تفاوت معنی داری نداشته است (P>0/05).



دیسک های حاوی عصاره چای سیاه و دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک

نمودار شماره 1: بررسی قطرهاله عدم رشد دیسک های حوی عصاره چای سیاه و مقایسه آنها با دیسک های استانداردآنتی بیوتیک با روش Disk diffusion

بحث و نتیجه گیری :

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از علل عمده عفونت های بیمارستانی معرفی شده است. با توجه به معضلاتی که این باکتری در سطح دنیا دارد و دومین عامل ایجاد کننده عفونت در زخم های بعد از جراحی است، انجام پژوهش های مختلف پیرامون این ارگانیسم ضروری است(Wilson *et al* ,2005 و Coope *et al*, 2004).

تاکنون گزارشهای بسیاری درباره اثرات ضد میکروبی انواع چای(Bandyopadnyay *et al*, 2005) و پلی فنل های خالص آن(Taguri *et al*, 2004) در برابر انواع میکروبها منتشر شده اند. اثرات سینرژیسمی چای با آنتی بیوتیک ها نیز گزارش شده اند(Isogia *et al*, 2001).

www.SID.ir

Archive of SID

توط و همکاران در سال 1989 ثابت کردند که عصاره های چای باعث کشتن یا ممانعت از رشد باکتریهای بیماریزایی مانند استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمایدیس، شیگلا دیسانتری و گونه های ویبیو کلرا می گردد(Toda *et al*,1989) .

همچنین دیگر پژوهش ها نشان دادند که پلی فنل‌های برگ‌های سبز چای اثر مهاری بر رشد اشریشیاکلی، استرپتوکوک‌ها و استافیلوکوک اورئوس و بوردتلا پوردتوسیس (عامل سیاه سرفه) دارد (Horiuchi *et al* ,1992) .

با توجه به یافته های حاصل از این پژوهش اثر بازدارنده عصاره چای سیاه در شرایط Invitro بر رشد باکتری استافیلوکوکوس مشاهده شده است که با سایر پژوهش ها در این زمینه مطابقت دارد . تاثیر عصاره چای سیاه در غلظت100 mg/ml بیشترین اثر مهارکنندگی را دارد. اثر مهارکنندگی رشد عصاره چای سیاه با غلظت 50 mg/ml در مقایسه با آنتی بیوتیک های سفازولین، سیپروفلوکساسین و ونکومایسین تفاوت معنی داری ندارد.

با توجه به اینکه اثرات ضد باکتریایی چای سیاه عمدتا به ترکیبات پلی فنلی آنها نسبت داده شده است، پژوهشگران به مطالعه اثرات ضد باکتریایی دیگر پلی فنل های غذایی پرداختند. در مطالعه ای روی پلی فنل های دانه های گیاه پریلا بیشترین اثر ضد باکتریایی روی استرپتوکوکوس موتانس در لوتئولین، یکی از پلی فنل های دانه پریلا مشاهده شد. اثرات مهاری پلی فنل های سیب و برخی گیاهان دیگر نیز گزارش شده است(Yanagida,2000).

با توجه به یافته های حاصل از این پژوهش و مقایسه آن با سایر مطالعات در این زمینه می توان عصاره چای سیاه را در کنترل و مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی دانست، بدیهی است که استفاده از عصاره چای سیاه با غلظت های مختلف نیازمند پژوهش های بیشتر در این زمینه می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

1- ارض پیما، ف.ا.، 1378. تاریخچه چای و صنعت چای در ایران، انتشارات سازمان چای ایران، صفحه 220.

2- خلجی، ن. نیستانی، ت. 1385. مطالعه اثر مهاری چای سیاه و چای سبز بر رشد باکتری اشریشیاکلی بیماریزا در محیط آزمایشگاه، فصلنامه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، 1(3) ، 38-33.

3- شعاع حسنی، ع.، اردوزاده، ن.، قائمی، ه.، نظری،ر .،حمدی، ک.، حکمت پو.،د. 1387. مقایسه اثرات چای سیاه و چای سبز بر رشد و تشکیل بیوفیلم در میکروارگانیسم های خانواده انتروباکتریاسه ، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، 2(43)، 73-64.

4- معمارزاده، ع. ولیدی،م. مبینی، غ. رفیعیان کوپایی، م و منصوری، ش. 1391. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره چای سیاه بر روی باکتری های مولد التهاب ملتحمه چشم در شرایط آزمایشگاهی، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، (14)4، 69-61.

5- Adwan GH, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in Raw Milk in the North of Palestine. Turk J Biol 2005;29:229-232.

6- BandyopadnyayD, chatterjee TK, Dasgupta A, Lourduraja J, DastidarSG. Invitro and invivio antimicrobial action of tea: The commonest beverage of Asia. Biol pharm Bull. 2005; 28: 2125-7.

7- Chou CL; Lin LL; Chung KT., (1999).The antibacterial effect of gallic acid and related compounds on *Staphylococcus aureous*. Int. J. Food Microbiol. 48: 125-30.

8- Cooper BS, Stone SP, Kibbler CC, Cookson BD, Roberts JA, Medley GF, et al. Isolation measures in the hospital management of the methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA): systematic review of the literature. BMJ 2004; 329(7465): 533-40.

9- El-Ghodban A, Ghenghesh KHS, Ma Rialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR Detection of Toxic Shock Syndrome Toxin of Staphylococcus aureus from Tripoli, Libya. J Med Microbiol 2006;55:179-182.

10- Grundmann H, Aires De Sousa M, Boyce J & Tiemersma R. Emergence and resurgence of methicillin resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. Lancet 2006; 368(9538): 874-85.

11- Horiuchi Y, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Protective activity of tea and catechins against Bordetella pertussis. Journal of Japanese Association Infection Disease 1992; 66: 599-605.

12- Isogia E, Hirose k, Hayashik Hayashis O. The invivo synergy between green tea extract and levofloxacin a gainst etnterhemorrhagic Escherichia coli 0157 infection. Curr Microbiol. 2001; 42: 248-51.

13- Nataro JP. Atypical enteropathogenic Escherichia coli: typical pathogens? Emerg Infect Dis. 2006 Apr; 12(4): 696.

14- TaguriT, Tanakat, kounoI. Antimicrobial activity of 10 different plant poly phenols against bacteria causing food-borne disease. Biol pharm Bull. 2004: 27:1965-9.

15- Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. Letters in Applied Microbiology 1989; 8: 123-125.

16- Turkyilmaz S, Kaya O. Determination of some Virulence Factors in *Staphylococcus Spp* Isolated from Various Clinical Samples. Turk J Vet Anim Sci 2006;30:127-132.

17- Wilson J. Clinical microbiology: an introduction for health-care professionals. Translated by Khalili MB. Tehran: Cheraghe Danesh; 2005: 70-1[Book in Persian].

18- Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F,Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. J Agric Food Chem.2000;48:5666-71.

www.SID.ir