

بررسی خواص ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی و عصاره چای سفید (*Camellia sinensis*) بر باکتری‌های اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوزنز

افسانه وفا^۱، مریم قانع^{۲*}، لاله بابائی خو^۲

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

* نویسنده مسئول: ma.ghane@iau.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۶، پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲

چکیده

اثرات ضد میکروبی چای بر روی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها ثابت شده است. پروبیوتیک‌ها، مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارند. این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی و عصاره چای سفید (*Camellia sinensis*) بر روی اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوزنز، انجام شد. برای این منظور، عصاره چای سفید تهیه شد و خواص ضد میکروبی آن بر علیه اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوزنز به روش رقیق‌سازی در لوله و انتشار دیسک، مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین لاکتوباسیلوس کازئی کشت داده شد و پس از تهیه مایع رویی، خواص ضد میکروبی مایع رویی و اثر هم‌افزایی آن با عصاره چای سفید با روش انتشار چاهک بررسی شد. نتایج، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی از عصاره چای سفید با ناحیه بازدارندگی $15 \pm 0/4$ و $18 \pm 0/6$ میلی‌متر را به ترتیب برای اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوزنز نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره چای سفید برای لیستریا منوسایتوزنز $6/5$ و $12/5$ و برای اشریشیاکلی $12/5$ و 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. ترکیب عصاره چای سفید و مایع رویی لاکتوباسیلوس کازئی خاصیت بازدارندگی با قطر $23 \pm 0/6$ و $20 \pm 0/2$ میلی‌متر به ترتیب برای اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوزنز ایجاد کرد. نتایج نشان داد که چای سفید دارای خواص ضد میکروبی قابل توجهی است و مایع رویی لاکتوباسیلوس کازئی می‌تواند فعالیت ضد میکروبی آن را به میزان قابل توجهی افزایش دهد. این ترکیب می‌تواند به عنوان یک کاندید امیدوارکننده به عنوان افزودنی غذایی برای مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا منتقله از غذا، در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس کازئی، خواص ضد میکروبی، چای سفید، اشریشیاکلی، لیستریا منوسایتوزنز

مقدمه

به‌طور وسیعی در دنیای پزشکی بر علیه عوامل بیماری‌زا در انسان و یا حیوانات، استفاده می‌شوند. امروزه باکتری‌های مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی، تهدیدی حیاتی برای سلامت انسان هستند و گسترش قابل توجهی در بسیاری از کشورها پیدا کرده‌اند (۲). پیدایش سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک، محققین را بر آن داشته تا با روش‌های جدید و به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مفید، درمان و کنترل بیماری‌ها را میسر سازند. استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده در مواد غذایی به منظور داشتن اثر سلامت بخشی در انسان، از دیرباز در کشورهای مختلف جهان رایج بوده است. پروبیوتیک‌ها به دلیل خاصیت درمانی و اثرات مفید بر سلامت، از جایگاه ویژه‌ای در دنیا برخوردارند. پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای تعریف می‌شوند که وقتی به مقدار کافی استفاده

افزایش بیماری‌هایی که در اثر مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا یا توکسین آن‌ها ایجاد می‌شوند، سال‌های زیادی است که به‌عنوان یک موضوع مهم و حیاتی برای بهداشت عمومی، در نظر گرفته می‌شود. باکتری‌ها بیش از سایر عوامل بیماری‌زایی که به‌وسیله غذا منتقل می‌شوند، سبب بروز و شیوع بیماری شده‌اند. باکتری‌هایی مانند سالمونلا، لیستریا منوسایتوزنز و اشریشیاکلی بیشترین بیماری و مرگ را سبب شده‌اند. علاوه بر مرگ‌ومیر بالایی که این باکتری‌ها ایجاد می‌کنند، هزینه زیادی نیز برای درمان بیماری‌های حاصل از مصرف غذاهای آلوده صرف می‌گردد (۱). آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیبات طبیعی، سنتزی و با خاصیت ضد میکروبی هستند که

واکنش‌های شیمیایی متفاوتی قرار می‌گیرند که منجر به رنگ، طعم و ویژگی‌های متمایز متفاوتی می‌شود. چای سفید از برگ‌های جوان چای (جوانه و دو برگ بالایی بوته) تولید می‌شود. برگ‌های جوان چای نسبت به برگ‌های مسن‌تر از محتوای پلی‌فنلی بیشتر و دارای انواع ترکیبات فنلی می‌باشد. چای سفید کمترین میزان فرآوری را داشته و بدون اکسیداسیون یا با اکسیداسیون کم انجام می‌شود. چای سیاه تحت پردازش طولانی قرار می‌گیرد و کاملاً اکسید می‌شود، بنابراین طعم قوی و رنگ تیره دارد. چای سفید و سیاه هر دو حاوی پلی‌فنول هستند، اما ترکیب آن‌ها به دلیل فرآیند تخمیر متفاوت است (۱۰). برگ‌های چای رایج‌ترین منابع پلی‌فنل‌ها هستند که اثرات ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی مختلف دارند (۱۱). اثرات ضد میکروبی چای سبز در مطالعات گوناگون، نشان داده شده است؛ اما مطالعات انجام شده بر روی اثرات مهار چای سفید بر رشد باکتری‌ها و به‌ویژه باکتری‌های با منشأ غذایی بسیار اندک است. چای سفید یکی از انواع چای است که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است، زیرا به ندرت یافت می‌شود و این نوع چای قیمت بالایی دارد (۱۲). همچنین تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثر هم‌افزایی عصاره چای سفید و باکتری‌های پروبیوتیک در از بین بردن باکتری‌ها صورت نگرفته است، لذا در این مطالعه خاصیت ضد میکروبی عصاره چای سفید و سوپرناتانت پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* بر *اشریشیا کلی* و *لیستریا منوسایتوزنز* به‌عنوان باکتری‌های بیماری‌زا، مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

تهیه عصاره چای سفید

مقدار ۱۰ گرم از پودر خشک شده گیاه چای سفید در داخل بطری‌های درپنج‌دار، قرار داده شد و حجم آن با حلال آبی به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر، رسانده شد. سپس بطری بر روی شیکر به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و پس از آن عصاره به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی، صاف شد. محلول به‌دست‌آمده در دستگاه تقطیر ریخته شد. پس از تبخیر حلال، عصاره زیر لامپ فرابنفش با طول‌موج بین ۲۸۰ تا ۴۰۰ نانومتر، به مدت ۲۰ دقیقه، قرار داده شد تا استریل و عاری از باکتری گردد. سپس درون ظرف تیره

شوند، برای سلامتی مفید هستند (۳). پروبیوتیک‌ها عمدتاً از جنس *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* بوده و دارای خصوصیات نظیر: تحمل اسید و املاح صفراوی، تولید اسیدهای ارگانیک، ترکیبات ضد میکروبی و تجمع‌پذیری سلولی با باکتری‌های بیماری‌زا، ممانعت از اتصال باکتری‌های بیماری‌زا به سطوح دستگاه گوارشی و... می‌باشند (۴). پروبیوتیک‌ها به‌طور مطلوب باعث تعادل میکروفلور روده، مانع رشد باکتری‌های مضر، افزایش عملکرد ایمنی و افزایش مقاومت در برابر عفونت می‌شوند. دیگر مزایای فیزیولوژیکی پروبیوتیک‌ها شامل: حذف سرطان‌زها، ایمن‌سازی و کاهش اثر آلرژی، کاهش کلسترول و کاهش عدم تحمل لاکتوز، می‌باشد (۵). نقش ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها در مطالعات مختلف، به اثبات رسیده است (۶، ۷). نقش ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک به‌طور عمده به دلیل تولید اسیدهای آلی (اسید استیک و اسیدلاکتیک) در حین تخمیر کربوهیدرات‌ها و کاهش اسیدیته می‌باشد. علاوه بر این، باکتری‌های پروبیوتیک قادر به تولید موادی مانند باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالیدی، آمونیاک، اسیدهای چرب آزاد هستند که بر روی رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی دارند. برخی از این مواد باعث بازدارندگی رشد برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن منتقله از غذا و میکروارگانیسم‌های عامل فساد غذا مانند *لیستریا*، *کلستریدیوم* و *آنتروکوک*، برخی از *باسیلوس*‌ها و *استافیلوکوک*‌ها می‌شوند (۸). ترکیبات به‌دست‌آمده از گیاهان می‌توانند به‌عنوان عوامل ضد میکروبی در داروها و نگهدارنده‌های غذایی، عمل کنند. چای از عمده‌ترین نوشیدنی‌های مصرفی در جهان، می‌باشد. گیاه چای بومی جنوب شرقی آسیا بوده و چای از برگ‌های جوان گیاه چای با نام علمی *Camellia sinensis* تهیه می‌شود. انواع مختلفی از چای را می‌توان از برگ چای تازه از طریق روش‌های مختلف فرآوری تولید کرد. از اثرات مفید چای می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدباکتری، ضدویروسی، کاهش فشارخون، تقویت سیستم ایمنی، محافظت از قلب، بهبود سلامت دهان، کنترل وزن بدن، سلامت پوست و محافظت‌کننده عصبی، اشاره نمود (۹). انواع مختلفی از چای در دسترس هستند که عبارتند از: چای سفید، زرد، قرمز و سیاه. انواع مختلف چای تحت

رنگ قرار داده شد و به دور از نور و در یخچال، نگهداری شد (۱۲).

تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار از دیسک

ابتدا از باکتری‌های /شریشیاکلی (PTCC 1395) و لیستریا منوسایتوزنز (PTCC 1297) تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران) سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. دیسک بلانک آغشته شده به عصاره چای سفید بر روی محیط کشت قرار داده شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین و تراسایکلین (پادتن طب، ایران) به‌عنوان کنترل، استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند.

بررسی حداقل غلظت مهارتی و حداقل غلظت کشندگی چای سفید بر باکتری‌های هدف

جهت تعیین حداقل غلظت مهارتی (MIC)^۱ و حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۲، از روش رقیق‌سازی در لوله، استفاده گردید. MIC در حقیقت حداقل غلظتی از ماده ضد میکروبی است که بتواند مانع رشد میکروارگانیسم شود و اگر این عامل از محیط حذف شود میکروارگانیسم مجدداً قادر به رشد خواهد بود. MBC، حداقل غلظتی از ماده ضد میکروبی است که بتواند ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را نابود کند و اگر از آن کشت ثانویه انجام شود کمتر از ۰/۱ درصد از باکتری‌های اولیه رشد کنند (۱۳). ابتدا از عصاره چای سفید به دست آمده رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲ و ۱:۶۴، تهیه شد (غلظت اولیه عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است)، به این ترتیب که ابتدا در ۶ لوله آزمایش محیط کشت مولر هینتون برات (مرک، آلمان) ریخته شد (در هر لوله ۲ میلی‌لیتر) و ۲ میلی‌لیتر عصاره چای سفید به لوله اول اضافه شد، سپس از لوله اول ۲ میلی‌لیتر محلول به لوله دوم، از لوله دوم ۲

میلی‌لیتر به لوله سوم و تا لوله ششم و در نهایت ۲ میلی‌لیتر محلول از لوله ششم دور ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مورد نظر با کدورت نیم مک‌فارلند به هریک از لوله‌های آزمایش اضافه شد و همه لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از سپری شدن مدت زمان انکوباسیون، محتوای لوله‌ها از نظر کدورت مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظتی که در آن رشدی مشاهده نگردید، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای MBC محتوای هریک از لوله‌هایی که رشدی در آن‌ها صورت نگرفته بود در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند، سپس نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

تهیه سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک

سویه پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC 1608) (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) در محیط مایع MRS^۲ (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط بی‌هوایی کشت داده شد و سپس سویه کشت داده شده با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی که حاوی مواد پروبیوتیکی بود، جداسازی شد (۶).

تعیین حساسیت میکروبی سوپرناتانت بر باکتری‌های هدف به روش چاهک

از باکتری‌های /شریشیاکلی و لیستریا منوسایتوزنز سوسپانسیون با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه شد و در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس توسط پیپت پاستور استریل در محیط کشت چاهک ایجاد گردید و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت تهیه شده داخل چاهک ریخته شد و تحت شرایط هوایی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه گذاری شد (۱۴).

¹ Minimum Inhibitory Concentration

² Minimum Bactericidal Concentration

³ Man, Rogosa and Sharpe

مستقل استفاده گردید و سطح معنی داری برابر ۰/۰۵، در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره چای سفید

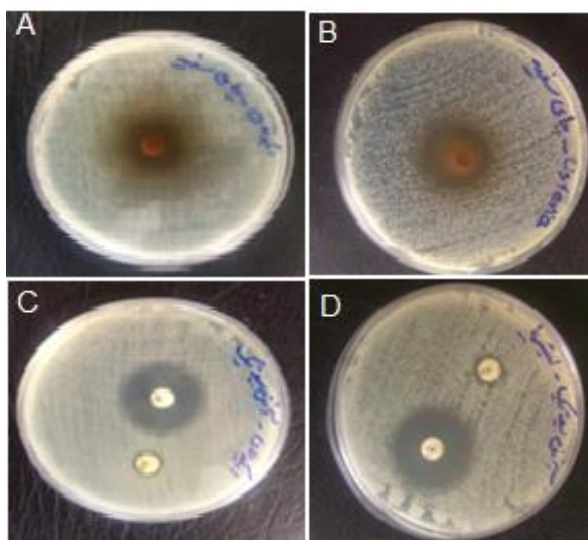
نتایج حاصل از بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره چای سفید با استفاده از آزمون دیسک دیفیوژن در شکل (۱) و جدول (۱) نشان داده شده است، همان گونه که مشاهده می شود عصاره چای سفید بر روی هر دو باکتری، اثر ضد میکروبی داشته است.

بررسی اثر هم افزایی چای سفید و متابولیت های پروبیوتیک

ابتدا از باکتری های /شیریشیاکلی و لیستریا منوسایتوژنز، سوسپانسیون با غلظت معادل نیم مک فارلند تهیه نموده و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس با استفاده از پپت پاستور استریل یک چاهک در داخل محیط کشت ایجاد گردید و مخلوط متابولیت های پروبیوتیکی و عصاره چای سفید با نسبت ۱ به ۱ در داخل چاهک ریخته شد. سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و پس از سپری شدن مدت زمان انکوباسیون هاله های عدم رشد، مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماری

کلیه آزمون ها، با سه تکرار انجام شد. در این مطالعه به منظور تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از برنامه SPSS و ویرایش ۱۹ و آزمون های آماری ANOVA و آزمون T



شکل ۱- بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره چای سفید بر روی باکتری های مورد مطالعه با روش انتشار از دیسک. اثر عصاره چای سفید بر باکتری /شیریشیاکلی (A) و لیستریا منوسایتوژنز (B). اثر آنتی بیوتیک های جنتامیسین و تتراسایکلین بر باکتری /شیریشیاکلی (C) و لیستریا منوسایتوژنز (D).

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد عصاره چای سفید بر روی اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوژنز بر حسب میلی متر

عصاره / آنتی بیوتیک	اشریشیاکلی	لیستریا منوسایتوژنز
عصاره چای سفید	۱۵ ± ۰/۴	۱۸/۴ ± ۰/۴
جنتامیسین	۲۴ ± ۰/۲	۲۵ ± ۰/۲
تتراسایکلین	۸ ± ۰/۲	۹ ± ۰/۲

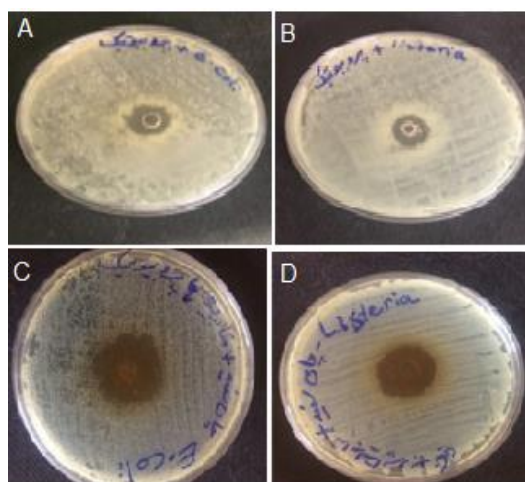
قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شده است. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (۳ تکرار) ذکر شده است.

نتایج حاصل از آزمون های MIC و MBC

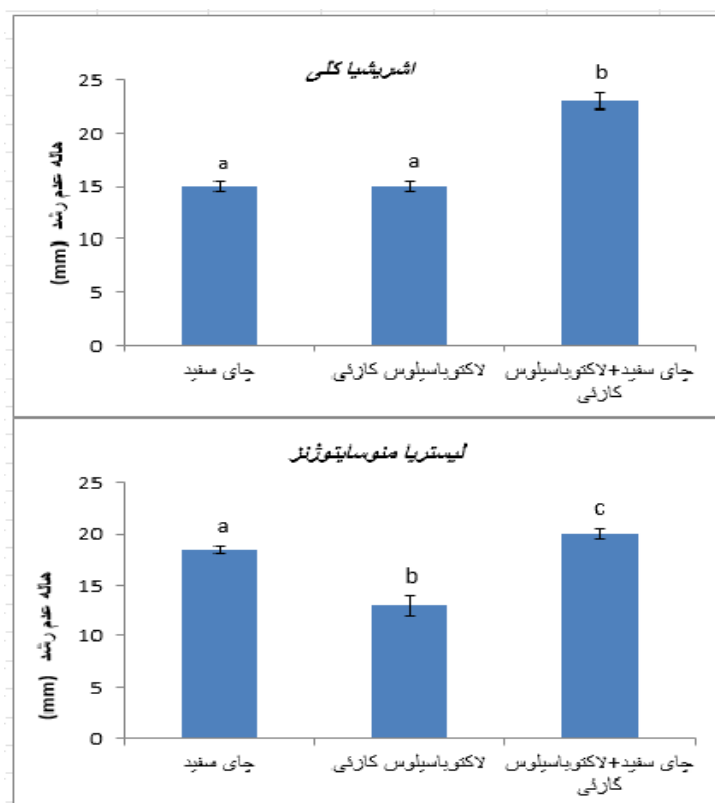
حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری کشی عصاره چای سفید بر روی باکتری های اشریشیاکلی و لیستریا منوسایتوژنز، مورد بررسی قرار گرفت. میزان MIC و MBC این عصاره برای باکتری اشریشیاکلی به ترتیب ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای باکتری لیستریا منوسایتوژنز به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

بررسی خواص ضد میکروبی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی و اثر هم افزایی آن با چای سفید

نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد میکروبی سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی و نیز اثرات هم افزایی عصاره چای سفید و سوپرناتانت باکتری



شکل ۲- اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی و اثر هم افزایی آن با چای سفید بر روی باکتری های مورد مطالعه با روش انتشار از چاهک. هاله عدم رشد ناشی از تأثیر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی بر باکتری اشریشیاکلی (A) و لیستریا منوسایتوژنز (B). تأثیر ضد میکروبی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی و چای سفید بر روی اشریشیاکلی (C) و لیستریا منوسایتوژنز (D).



نمودار ۱- اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی، عصاره چای سفید و ترکیب این دو ماده بر روی باکتری‌های اشریشیا کلی و لیستریا منوسایتوزنز. حروف متفاوت در روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

ضدمیکروبی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی به تنهایی و اثر هم‌افزایی عصاره چای سفید با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی نیز سنجیده شد و نتایج نشان داد که به‌کارگیری همزمان عصاره چای سفید و لاکتوباسیلوس کازئی به مراتب بیشتر از زمانی است که عصاره چای سفید و یا پروبیوتیک به تنهایی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه اثر داده شود ($P < 0.05$). در این پژوهش اثر عصاره‌ی برگ‌های جوان چای با دو آنتی‌بیوتیک جنتامیسین و تتراسایکلین بر روی دو باکتری گرم‌مثبت و گرم‌منفی (لیستریا منوسایتوزنز و اشریشیا کلی)، به روش انتشار دیسک، مقایسه شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، قطر هاله عدم رشد تتراسایکلین در مقایسه با چای سفید، کمتر بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در مقابل، اثر آنتی‌بیوتیک جنتامیسین نسبت به این عصاره برتری داشت. همسو با مطالعه حاضر، اثرات ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدویروسی گیاه چای در مطالعات پیشین به اثبات رسیده است. مطالعات نشان داده که عصاره چای اثرات ضدمیکروبی بر روی انواع باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی

بحث

لیستریا منوسایتوزنز و اشریشیا کلی از جمله شایع‌ترین علل بیماری‌های ناشی از غذا در انسان هستند که باعث مرگ‌ومیر و بستری شدن در بیمارستان و صرف هزینه بالا می‌شوند (۱۵). با توجه به افزایش مقاومت میکروبی و عوارض جانبی مواد نگهدارنده شیمیایی نیاز فوری به یک عامل ضدمیکروبی جایگزین با عوارض جانبی کمتر وجود دارد. در این میان استفاده از فرآورده‌های گیاهی با توجه به منابع غنی گیاهی کشور ایران و نیز پذیرش بالای آن از سوی جامعه و هزینه‌ی مناسب این فرآورده‌ها منطقی به نظر می‌رسد. این تحقیق به جهت بررسی اثربخشی عصاره گیاه چای سفید بر روی باکتری‌های اشریشیا کلی و لیستریا منوسایتوزنز انجام پذیرفته است. برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی اولیه از روش انتشار دیسک استفاده شد و سپس از تکنیک رقیق‌سازی در لوله استفاده گردید. نتایج حاصل از روش انتشار دیسک، نشان داد که عصاره چای سفید اثر ضدمیکروبی قابل‌ملاحظه‌ای بر روی باکتری‌های مورد مطالعه دارد. علاوه بر این اثرات

مانند استافیلوکوکوس اورئوس، سویه‌های انتروکوکوس، سویه‌های سالمونلا و اشریشیاکلی دارد (۱۶). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۳ بر روی اثر ضد میکروبی چای سبز انجام گرفت نیز اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مختلف چای سبز خاصیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس، نشان دادند (۱۷). در مطالعه حاضر، چای سفید بر روی هر دو باکتری مورد مطالعه اثر ضد میکروبی نشان داد با این وجود تأثیر ضد میکروبی آن بر روی باکتری لیستریا منوسایتوتونز بیشتر از باکتری اشریشیاکلی بود ($P < 0.05$). مطالعات پیشین ثابت کرده است که باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت حساسیت کمتری به عصاره‌های گیاهی نشان می‌دهند (۱۸، ۱۹). بر اساس مطالعات، دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، نفوذپذیری و حساسیت بیشتری نسبت به عوامل ضد میکروبی دارند. لایه لیپوپلی ساکراید و فضای پری پلاسمی باکتری‌های گرم منفی ممکن است دلیل مقاومت نسبی آن‌ها در برابر ضد میکروبی‌ها باشد (۱۹). در باکتری‌های گرم مثبت، لایه‌های پپتیدوگلیکان متخلخل است و به آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیایی و حتی داروهای گیاهی اجازه دسترسی به غشای سلولی را می‌دهند. در مطالعه Dinçer و همکاران در سال ۲۰۲۳، اثر عصاره ۴ نوع چای مختلف بر روی پاتوژن‌های غذایی از جمله اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا منوسایتوتونز مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه فعالیت ضد میکروبی انواع مختلف چای نشان داد که چای سیاه فعالیت ضد میکروبی کمتری نسبت به سایر انواع چای از خود نشان می‌دهد. بیشترین فعالیت ضد میکروبی در برابر سویه‌های لیستریا منوسایتوتونز در چای سفید با MIC به میزان ۰/۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد (۲۰). در مقایسه با مطالعه حاضر، عصاره مورد مطالعه در تحقیق آنان MIC پایین تری را در برابر لیستریا منوسایتوتونز نشان داد که از دلایل آن می‌توان به نوع چای مورد مطالعه، روش عصاره‌گیری و نوع حلال به کاررفته در عصاره‌گیری اشاره نمود. همچنین در راستای نتایج حاصل از مطالعه آنان، در این مطالعه عصاره چای سفید با استفاده از روش انتشار از دیسک بر روی لیستریا منوسایتوتونز اثر ضد میکروبی قوی تری را نسبت به

اشریشیاکلی نشان داد. در مطالعه Granato و همکاران (۲۰۱۶)، با ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های چای سیاه، سبز و سفید در برابر برخی از پاتوژن‌های موجود در غذا، مشابه مطالعه حاضر، چای سفید بهترین اثر را در برابر لیستریا منوسایتوتونز نشان داد (۲۱) که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. Camargo و همکاران (۲۰۱۶)، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی چای سیاه، سبز و سفید را بررسی کردند و دریافتند که چای سفید دارای بالاترین محتوای فنلی کل است. آن‌ها این موضوع را با اکسید شدن کاتچین‌ها به تیافلاوین و تیاروبیگین در مرحله تخمیر تولید چای سیاه، توضیح دادند (۲۲). خاصیت ضد میکروبی مشاهده شده در این تحقیق مربوط به محتوای پلی فنلی چای سفید از جمله کاتچین‌های آن است. از آنجاکه در پروسه آماده‌سازی چای سفید پلی فنل‌های آن به مقدار زیادی حفظ می‌شود، این چای نسبت به سایر انواع چای، خاصیت ضد میکروبی بیشتری نشان می‌دهد که این خود از جمله دلایل انتخاب چای سفید در این تحقیق بود. مطالعات زیادی نشان داده که عصاره چای سفید و یا کاتچین‌های استخراج شده از آن‌ها بر روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مؤثرند (۲۳). چای سفید از برگ‌ها یا جوانه‌های جوان چای پوشیده شده با موهای نقره‌ای رنگ تهیه می‌شود که برای جلوگیری از اکسید شدن، سریعاً خشک می‌شوند. به همین دلیل، چای سفید مقدار زیادی پلی فنول را حفظ می‌کند. ترکیبات فعال زیستی اصلی پلی فنول‌های چای سفید کاتچین‌ها هستند. کاتچین‌ها، مولکول‌هایی هستند که بیشترین نقش را در فعالیت ضد باکتریایی چای سفید علیه استرپتوکوک‌ها دارند (۲۳). در مرحله بعدی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی بر روی سویه‌های مورد مطالعه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که سوپرناتانت سویه پروبیوتیک فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای روی هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی داشت. هم‌راستا با مطالعه حاضر، در تحقیق انجام شده توسط سلیمان زاده و همکاران نیز، سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی هر دو باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (اشریشیاکلی)، اثر ضد میکروبی نشان داد (۲۴). اثر ضد میکروبی سوپرناتانت لاکتوباسیل‌ها بر روی انواع باکتری‌های پاتوژن در مطالعات گوناگون به اثبات رسیده

2. Amiri M, Ghane M, Khou L. Molecular typing and investigating the presence of efflux genes in urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae*. 2019;30(1):8-20.
3. Quigley EM. Prebiotics and probiotics in digestive health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(2):333-44.
4. Ershadian M, Branch D, Azad I. The antimicrobial and co-aggregation effects of probiotic lactobacilli against some pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2015;9 (3):14-22.
5. Anas M, Eddine HJ, Mebrouk K. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 2008;3(2): 39-49.
6. Ghane M, Babaeekhou L, Ketabi SS. Antibiofilm activity of kefir probiotic lactobacilli against uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2020;12(4):221-229.
7. Ghane M, Babaeekhou L, Najafabadi BM, Mirmostafa MS. Lactic acid bacteria from kefir grains: Potential probiotics with antagonistic activity against multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2021;17(4):414-423.
8. Chavoshi FM, Imani FA, Saadatmand S. Antimicrobial effects of bacterial cell debris and supernatant of *Lactobacillus casei* isolated from yoghurt against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 2011;11(3):208-217.
9. Taylerson M. The health benefits of tea varieties from *Camellia sinensis*. *The Plymouth Student Scientist*. 2012; 5(1):304-312.
10. Hilal Y, Engelhardt U. Characterisation of white tea—comparison to green and black tea. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2007;2:414-21.
11. Bansal S, Choudhary S, Sharma M, Kumar SS, Lohan S, Bhardwaj V. Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food research international*. 2013;53(2):568-584.
12. Kusumawardani A, Sukmasari S, Mutalib NAA, Rahman SFA, Ichwan SJA. Comparative study of antimicrobial potential

است (۷،۶). فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت ممکن است به تولید باکتریوسین، اسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن نسبت داده شود (۲۵). در قدم بعدی اثر هم‌افزایی عصاره چای سفید و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی بر روی باکتری‌های هدف، مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات نشان داد که ترکیب عصاره چای سفید و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به عصاره چای سفید و یا لاکتوباسیلوس کازئی به تنهایی خاصیت ضد میکروبی بالاتری دارد. این افزایش بخصوص بر روی باکتری *اشریشیاکلی* مشهودتر بود. همسو با مطالعه حاضر، Su و همکاران در سال ۲۰۰۸، نشان دادند که استفاده همزمان از عصاره چای سبز و پروبیوتیک باعث کاهش معنی‌داری در رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پایوژنز*، می‌شود (۲۶).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که یک اثر هم‌افزایی بین عصاره چای سفید و لاکتوباسیلوس کازئی در رابطه با مهار رشد پاتوژن‌های مهم *اشریشیاکلی* و *لیستریا منوسایتوژنز*، وجود دارد. مطالعات بیشتر در مورد بررسی اثر هم‌افزایی عصاره چای سفید و پروبیوتیک‌ها در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌های باکتریایی، اولویت دارند. این مطالعه ترکیب عصاره چای سفید و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی را به‌عنوان یک کاندید امیدوارکننده برای توسعه دارو یا افزودنی‌های غذایی با هدف مبارزه با فساد مواد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زای ناشی از غذا، پیشنهاد می‌دهد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

References

1. Mashreghi M, Momtazi F. Comparison of the antibacterial effects of various concentrations of alcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Carthamus tinctorius* on the growth phases of *Escherichia coli* O157. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2012;11(2):103-14.

- extracts by electrospray ionization mass spectrometry and modeling of their in vitro antibacterial activity. *LWT-Food Science and Technology*. 2016;65:414-420.
22. Camargo L, Pedroso L, Vendrame S, Mainardes R, Khalil N. Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. *Brazilian Journal of Biology*. 2016;76:428-434.
23. Ho C-T, Lin J-K, Shahidi F. Tea and tea products: chemistry and health-promoting properties (1st edition): CRC press; 2008.
24. Soleymanzadeh Moghadam S, Minaeian S, Majidpour A, Adabi M, Hosseini Doust R. The *Lactobacillus acidophilus* supernatant: An effective and safe alternative to antibiotics. *Iranian Journal of Toxicology*. 2024;18(1):52-60.
25. Muhammad Z, Ramzan R, Abdelazez A, Amjad A, Afzaal M, Zhang S. Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner Mongolian fermented cheese against foodborne pathogens. *Pathogens*. 2019;8(2):71.
26. Su P, Henriksson A, Nilsson C, Mitchell H. Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008;24:1837-1842.
- of White tea and black tea leaf extracts from east Java-Indonesia on two species of oral streptococci. *Materials Today: Proceedings*. 2019;16:2226-2230.
13. Arabestani B, Babaeekhou L, Ghane M. Antibacterial activity of different *Artemisia dracunculus* extracts against dental caries-related pathogens. *Avicenna Journal of Dental Research*. 2023;15(3):87-91.
14. Ghane M, Babaeekhou L, Shams M. Antimicrobial activity of *Rhus Coriaria* L. and *Salvia Urmienensis* bunge against some food-borne pathogens and identification of active components using molecular networking and docking analyses. *Food Science and Technology*. 2022;42:e08221.
15. Cossetini A, Vidic J, Maifreni M, Marino M, Pinamonti D, Manzano M. Rapid detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* spp., and *Escherichia coli* in food using biosensors. *Food Control*. 2022;137:108962.
16. Jigisha A, Nishant R, Navin K, Pankaj G. Green tea: a magical herb with miraculous outcomes. *International Research Journal of Pharmacy*. 2012;3(5):139-148.
17. Alghamdi AI. Antibacterial activity of green tea leaves extracts against specific bacterial strains. *Journal of King Saud University-Science*. 2023;35(5):102650.
18. Fathi M, Ghane M, Pishkar L. Phytochemical composition, antibacterial and antibiofilm activity of *Malva sylvestris* against human pathogenic bacteria. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2022;17(1): e114164.
19. Koohsari H, Ghaemi E, Sheshpoli MS, Jahedi M, Zahiri M. The investigation of antibacterial activity of selected native plants from north of Iran. *Journal of medicine and life*. 2015;8(2):38-46.
20. Dinçer E, Bağlam N. Determination of the antimicrobial activity of four different tea extracts against foodborne pathogens. *Hacettepe University Faculty of Health Sciences Journal*. 10(3):610-624.
21. Granato D, do Prado-Silva L, Alvarenga VO, Zielinski AA, Bataglioni GA, de Moraes DR. Characterization of binary and ternary mixtures of green, white and black tea



Investigating the antimicrobial properties of *Lactobacillus casei* and white tea (*Camellia sinensis*) extract on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*

Afsaneh Vafa¹, Maryam Ghane^{*2}, Laleh Babaeekhou²

1- MSC, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran

*Corresponding Author: ma.ghane@iau.ac.ir

Received: 06/12/2024, Accepted: 11/01/2025

Abstract

The antimicrobial effects of tea have been proven on many microorganisms. Probiotics are microbial food supplements that have beneficial effects on human health. This study was conducted to investigate the antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* and white tea (*Camellia sinensis*) extract on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. For this purpose, white tea extract was prepared and its antimicrobial properties against *E. coli* and *L. monocytogenes* were evaluated by broth dilution and disk diffusion methods. *L. casei* was also cultured and after preparing the supernatant, the antimicrobial properties of the supernatant and its synergistic effect with white tea extract were investigated by well diffusion method. The results showed significant antimicrobial activity of white tea extract with inhibition zones of 15 ± 0.4 and 18 ± 0.6 mm for *E. coli* and *L. monocytogenes*, respectively. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of white tea extract for *L. monocytogenes* were 6.5 and 12.5 and for *E. coli* were 12.5 and 25 mg/ml. The combination of white tea extract and *L. casei* supernatant produced inhibitory properties with an inhibition zone of 23 ± 0.6 and 20 ± 0.2 mm for *E. coli* and *L. monocytogenes*, respectively. The results showed that white tea has significant antimicrobial properties and *L. casei* supernatant can significantly enhance its antimicrobial activity. This combination can be considered as a promising candidate as a food additive to combat foodborne pathogenic bacteria.

Keywords: *Lactobacillus casei*, antimicrobial properties, white tea, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*