Iranian Journal of Biological Sciences.2022; 17(1):49-58

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Anti-yeast comparative activities of aqueous and alcoholic extracts of black tea (Camellia sinensis), grape seed (Vitis vinifera L.) and Clotrimazole on Malassezia pachydermatis (ATCC 10231)

*Ghorbannia Delavar A1, Qhasemi N2, Onsinezhad M2, Hashemi Karoii SM3, Gholampour Azizi I3**

1. Assistant professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2. Gradated student, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.
3. Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Laboratory of Faculty Veterinary Medicine, Babol branch of Islamic Azad University

Article Info

Article History:
Recived 7.29.2022
Revised 8.24.2022
Accepted 9.5.2022
Online 9.20.2022

KeyWords:
black tea
grape seed
antimicrobial
Malassezia pachydermatis
clotrimazole

***Corresponding author:**
E-mail address
azam.ghorbannia@gmail.com
ava.ghasemi890@gmail.com
m.onsinezhad@gmail.com
mssepid4977@gmail.com
is.gholampour@iau.ac.ir

Abstract

Introduction: In recent years, resistance to a variety of drugs has developed due to the indiscriminate use of antimicrobials.
Aim: The aim of the present study was to compare aqueous, ethanolic and methanolic extracts of black tea(Camellia sinens) and grape seed (Vitis vinifera L.) on Malassezia pachydermatis (ATCC 10231).
Material and methodes: methods used in this study are included disk diffusion, agar well diffusion, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC).
Resultes: For black tea MIC was 25(10^3) μg/ml for the aqueous extract, 6250 μg/ml for the ethanolic extract and 125(10^2) μg/ml for the methanolic extract. MFC was 0 for the aqueous extract, 125(10^2) μg/ml for the ethanolic extract and 25(10^3) μg/ml for the methanolic extract. For grape seed MIC was 1250 μg/ml for the aqueous extract, 1250 μg/ml for the ethanolic extract and 33333 μg/ml for the methanolic extract. MFC was 16667 for the aqueous extract, 125(10^2) μg/ml for the ethanolic extract and 23611 μg/ml for the methanolic extract. The Clotrimazole diameter the zone of inhibition on Malassezia pachydermatis was determined between 35 and 47 mm in the disk and 40 to 49 mm in the well.
Conclusion: In all the extracts, an increasing trend of the zone of inhibition was observed with the increase in the volume of consumed extracts. Therefore, the extracts of these two plants have an accessible and natural antibiotic effect, but compared to Clotrimazole, a smaller the zone of inhibition appeared. However, the anti- yeast activity of grape seed extracts is more than that of black tea.

Cite this article: Ghorbannia Delavar A, Qhasemi N, Onsinezhad M, Hashemi Karoii SM, Gholampour Azizi I*. Anti-yeast comparative activities of aqueous and alcoholic extracts of black tea (Camellia sinensis) and grape seed (Vitis vinifera L.) on Malassezia pachydermatis (ATCC 10231) with that of the Clotrimazole. Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(1): 49-58

http://dx.doi.org/10.30495/zisti.2022.1964321.1129 DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.1.5.5
Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

مقایسه فعالیت ضد مخمری عصاره‌های آبی و الکلی چای سیاه (Camellia sinensis)، هسته انگور (Vitis vinifera L.) و کلوتریمازول بر مالاسزیا پاکی درماتیس (ATCC ۱۰۲۳۱)

اعظم قربان‌نیادلاور۱، نیوشا قاسمی۲، مریم انسی نژاد ۲، سید مسعود هاشمی کروئی۳، عیسی غلامپور عزیزی*۳

۱. استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۳. استادیار قارچ شناسی دامپزشکی، گروه دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۱/۵/۷
بازنگری ۱۴۰۱/۶/۲
پذیرش ۱۴۰۱/۶/۱۴
نمایه ۱۴۰۱/۶/۲۹

کلمات کلیدی
چای سیاه
هسته انگور
ضد میکروبی
مالاسزیا پاکی درماتیس
کلوتریمازول

* نویسنده مسؤل
azam.ghorbannia@gmail.com
ava.ghasemi890@gmail.com
m.onsinezhad@gmail.com
mssepid4977@gmail.com
is.gholampour@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، به علت استفاده بی‌رویه از داروهای ضد میکروبی، مقاومت به انواع داروها به وجود آمده است.

هدف: هدف از مطالعه حاضر مقایسه اثرات عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی چای سیاه (Camellia sinensis) و هسته انگور (Vitis vinifera L.) بر روی مالاسزیا پاکی درماتیس (ATCC ۱۰۲۳۱) است.

مواد و روش‌ها: روش‌های دیسک انتشار، چاهک گذاری در آگار و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) می‌باشد.

نتایج: میزان میانگین MIC برای چای سیاه عصاره آبی۳۳۳۳/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر، عصاره اتانولی۹۳۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و متانولی۶۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین میزان میانگین MFC عصاره آبی صفر، عصاره اتانولی۱۸۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و متانولی ۱۲۵۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص گردید. برای هسته انگور میزان میانگین MIC عصاره آبی۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، عصاره اتانلی ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و متانلی ۳۳۳۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین میزان میانگین MFC عصاره آبی ۱۶۶۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر، عصاره اتانولی ۱۲۵×۱۰^{۲} میکروگرم بر میلی‌لیتر و متانلی ۲۳۶۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص گردید. هاله عدم رشد کلوتریمازول روی مالاسزیا پاکی درماتیس در دیسک بین ۳۵ تا ۴۷ میلی‌متر و در چاهک ۴۰ تا ۴۹ میلی‌متر مشخص گردید.

نتیجه‌گیری: در تمامی عصاره‌ها یک روند افزایشی در هاله عدم رشد با افزایش حجم عصاره‌های مصرفی مشاهده شدند. بنابراین عصاره‌های این دو گیاه دارای اثر ضد مخمری قابل دسترس و طبیعی ضد میکروبی، هستند ولی در مقایسه با کلوتریمازول هاله عدم رشد کوچکتری ظاهر شدند. با این وجود فعالیت ضد مخمری عصاره‌های هسته انگور بیش از چای سیاه می‌باشد.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : قربان نیا دلاور الف، قاسمی ن، انسی نژاد م ، هاشمی کروئی م، غلامپور عزیزی ع*. مقایسه فعالیت ضد مخمری عصاره‌های آبی و الکلی چای سیاه (Camellia sinensis) و هسته انگور (Vitis vinifera L.) بر روی مالاسزیا پاکی درماتیس (ATCC ۱۰۲۳۱) و مقایسه‌ی آن با داروی کلوتریمازول. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۱؛ ۱۷ (۱): ۴۹-۵۸

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.1.5.5
http://dx.doi.org/10.30495/zisti.2022.1964321.1129

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۱۷۳۵-۴۲۲۶ **شاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-۴۵۹X **نویسندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

سازمان بهداشت جهانی اصرار بر تحقیق برای یافتن ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی دارد (۱). استفاده از گیاهان دارویی و طب سنتی در کشور ما دارای قدمتی طولانی است. ایران از لحاظ موقعیت جغرافیایی و شرایط آب و هوایی به گونه‌ای است که امکان رشد بسیاری از گیاهان در آن میسر می‌باشد (۲). به طور تقریبی حدود ۵۰۰ هزار گونه گیاهی در جهان شناسایی شده است (۳) که از آن میان کمتر از هزار گونه به عنوان گیاه دارویی نامگذاری شده‌اند (٤). درمان‌های ضدقارچی با استفاده از داروهای ضدقارچی کاملاً مؤثر نمی‌باشند و این امر به دلیل وجود اثرات جانبی ناشی از استفاده طولانی‌مدت از داروهای سنتتیک می‌باشد (٥).

کاربرد گیاه درمانی در درمان بیماری‌ها و به ویژه بیماری‌های عفونی در سال‌های اخیر روند رو به فزونی پیداکرده است، زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی به طور قابل-ملاحظه‌ای پایین است (٦). به علت ظاهر شدن عوارض نامطلوب و جانبی ترکیبات سنتتیک و عدم سازگاری آنها و همچنین به دلیل ارزبری و هزینه بالای تهیه داروها و ناتوانی بسیاری از کشورهای جهان سوم برای خرید چنین داروهایی توجه خاصی به سمت تهیه ترکیبات دارویی موثر و بی‌خطر از گیاهان معطوف شده است (۷).

چای بعد آب دومین نوشیدنی پر مصرف در جهان است و اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارد، اثرات ضدمیکروبی چای بررسی شده و هر چند فعالیت ضدقارچی ترکیبات آن مطالعات کمی صورت گرفته است (۸). چای سیاه (Camellia sinensis) از برگ‌های پژمرده و کبود شده و کاملا اکسید شده گیاه چای بدست می‌آید و سرشار از آنتی‌اکسیدان، کافئین، منیزیم، پتاسیم، سدیم، تئوفیلین، کلروفیل و تانن است. با بررسی به عمل آمده عصاره چای می‌تواند خاصیت هیدروفوبیسیتی و خودتجمعی کاندیدا را کاهش داده و در نتیجه از اتصال به سلول میزبان جلوگیری کند (۹).

هسته انگور با دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بسیار قوی به طور گسترده‌ای در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی و عروقی، زخم معده، چاقی مفرط و التهاب پوستی به کار می‌رود (۱۰،۱۱). Camargo و همکاران (۲۰۱٦) اثر ضد کاندیدیایی چای تخمیر شده را بیش از چای غیرتخمیری گزارش کردند (۱۲). عصاره‌های هسته انگور (GSE)، کلاژن و الاستین را تثبیت می‌کنند و در نتیجه خاصیت ارتجاعی، انعطاف‌پذیری و ظاهر پوست را بهبود می‌بخشند. عصاره‌های هسته انگور ایمن شناخته شده‌اند و توسط سازمان غذا و دارو تأیید شده‌اند و هیچگونه فعالیت سمی سلولی روی سلول‌های انسان و حیوان ندارند و نگهدارنده غذا برای گوشت و روغن ماهی می‌باشد (۱۳،۱٤). همه این خواص، همراه با فعالیت ضدقارچی بالا و عدم سمیت و غنی از پلیمر فلاوان تری اول (ols-۳-flavan)، در درمان عفونت‌های پوستی ناشی از درماتوفیت‌ها و مالاسزیا را پشتیبانی می‌کند (۱۵). ترکیبات فنلی هسته انگور به صورت اسید گالیک، کاتچین، اپی کاتچین، دایمریک پروسیانیدین و پروآنتوسیانیدین می‌باشند (۱۱).

مخمر مالاسزیا پاکی درماتیس یکی از مهمترین قارچ‌های فرصت‌طلب و ساپروفیت است که به صورت طبیعی روی پوست حیوان خون گرم ساکن است و اهمیت آن زمانی است که یک یا چند عامل نظیر ضعف سیستم ایمنی بدن، در انواع لوسمی‌ها، ترشح بیش از حد موم و چربی در کانال گوش و مصرف طولانی آنتی‌بیوتیک‌ها زمینه‌ساز بیماری‌زایی این مخمرند. این مخمر چربی‌گرای اختیاری و جزء فلور طبیعی پوست و گوش سگ، گربه و احتمالا سایر حیوانات است (۱٦). مشتقات آزول (نظیر کلوتریمازول) به طور گسترده‌ای برای درمان ضایعات مرتبط با این مخمر مورد استفاده واقع می‌شود. با این حال، آزمایشات نشان داده شده است که حساسیت این مخمر نسبت به این داروهای ضدقارچی کاهش یافته است (۱۷،۱۸). با توجه به بومی و در دسترس بودن چای سیاه و هسته انگور (GSE)، در این تحقیق عصاره آبی و الکلی این گیاهان بر مالاسزیا پاکی درماتیس به روش دیسک و چاهک مورد مقایسه قرار گرفتند و MIC و MFC این عصاره‌ها، ضمن مقایسه آنها با داروی کلوتریمازول‌اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها:

چای سیاه (Camellia sinensis) بعد شستشو با آب تمیز به طور لایه لایه در فضای گرم و سایه قرار داده و به طور کامل خشک شده و سپس پودر شدند و نیز هسته انگور (Vitis vinifera L.) جدا شده و به طور جداگانه توسط آسیاب برقی پودر شدند. پودرهای تهیه شده از آنها هر یک بطور جداگانه با استفاده از آب، اتانل ۹٦٪ و متانل ۹۸٪

مواد و روش‌ها:

به روش سوکسوله عصاره تهیه شدند و در مرحله بعد حلال حذف و سپس خشک شد و وزن عصاره خشک‌اندازه گیری شد (۱۹). در این مطالعه جهت افزایش دقت در تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی روش‌های دیسک، چاهک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) بکار گرفته شدند.

رقیق‌سازی عصاره

برای رقیق‌سازی عصاره مقدار ۰/۵ گرم از انواع عصاره (آبی، اتانلی و متانلی) را جداگانه و دقیق برداشت نموده و با ترازوی دیجیتال وزن شد و به داخل یک لوله آزمایش استریل ریخته و ٤/٥ سی‌سی حلال DMSO استریل به آن اضافه نموده و به طور کامل مخلوط شد. محلول ۰/۱ از آن تهیه شده، که در هر سی‌سی خود دارای ۱۰۵ میکروگرم (۰/۱ گرم یا ۱۰۰ میلی گرم یا ۱۰۵ میکروگرم یا ۱۰۸ نانوگرم) از ماده موثر بود.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

جهت تهیه سوسپانسیون مالاسزیا پاکی درمایتیس (ATCC۱۰۲۳۱) ابتدا در شرایط کاملا استریل از کلونی خالص مخمر به طور جداگانه نمونه گرفته، به آن ۱ سی سی Sabouraud Dextrose Broth استریل وارد کرده، و به آن یک الی دو قطره توئین (Tween ۸۰) اضافه نموده تا جهت آزمون‌های تعیین حساسیت استفاده شد. در ضمن نمونه مورد نظر را در انکوباتور ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲-٤٨ ساعت قرار می‌دهیم تا رشد کند و مخمرها کدورت آن را با لوله نیم مک فارلند شماره ۵ مقایسه گردید.

تعیین MIC

جهت تعیین MIC (حداقل غلظت مهارکننده رشد) عصاره‌ها (آبی، متانلی و اتانلی) روی این مخمر با انتخاب ۱۱ لوله حاوی یک سی‌سی محیط کشت Sbouaud Dextrose Broth انجام شد. رقت‌های یک دوم برابر از ماده ضدمیکروبی مورد نظر را ساخته، به این صورت که به لوله اول ۱ سی‌سی از محلول مادهء ضدمیکروبی که دارای مقدار ثابت و مشخصی از ماده موثره بود، وارد نموده و در مراحل بعدی در تمام لوله‌ها غیر از لوله آخر رقت‌های ۱/۲ از آن تهیه شد. لوله آخر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت تمام لوله‌ها دارای مقدار ثابت و معین از ماده شیمیایی در حجم معین از محیط کشت بودند. در مرحله بعد، به تمام لوله‌ها مقدار ۲۰ لاندا از سوسپانسیون قارچی که در هر سی‌سی خود واجد ۱×۱۰^{۶} مخمر بود، اضافه گردید. پس از انکوباسیون در دمای۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد کمترین غلظت یا به عبارت دیگر در بیشترین رقتی که کدورتی در آن مشاهده نشد، آن لوله به عنوان MIC در نظر گرفته شده یا بعبارتی مقدار ماده شیمیائی موجود در آن حداقل مقداری بود که مانع از رشد میکروارگانیزم وارد شده به محیط بود. معمولا این لوله کدورتی برابر با ۲۰٪ کدورت نمونه شاهد را دارا بوده یا بعبارتی دیگر کدورت آن ۸۰٪ کمتر از کدورت لوله شاهد بود. این عمل سه بار تکرار شد (۲۰).

تعیین MFC

جهت تعیین MFC (حداقل غلظت کشندگی قارچ‌ها) هر سه نوع عصاره (آبی، متانلی و اتانلی) روی مخمر، مقدار ۱۰ لاندا از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت برداشته و در محیط کشت سابورودکستروز آگار به صورت متراکم و با سوآپ استریل کشت داده شد و پس از آن ۲ تا ۳ روز پلیت‌ها را در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا قارچ رشد کند. غلظت عصاره مرتبط با پلیتی که فاقد مخمر مالاسزیا پاکی درمایتیس بود به عنوان حداقل غلظت کشنده قارچی ثبت گردید. یعنی مثلا اگر MIC لوله شماره ۵ باشد ما ۵ عدد پلیت می‌گیریم و از لوله شماره ۱ تا ۵ MIC به مقدار ۱۰ لاندا که یعنی در آن به مقدار ۱×۱۰^{٤} مخمر وجود دارد به داخل پلیت‌ها می‌ریزیم و به صورت ایزوله کشت می‌دهیم کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد را به عنوان MFC در نظر می‌گیریم. این عمل سه بار تکرار شد.

روش انتشار دیسک

جهت تعیین حساسیت مخمر به روش انتشار دیسک برای عصاره‌ها (آبی، متانلی و اتانلی) و داروی کلوتریمازول ابتدا مقادیر ٤٠، ٥٠، ٦٠ و ٧٠ لاندا عصاره آبی را به طور جداگانه در دیسک‌های استاندارد وارد نموده، آن‌ها را در داخل فور ٤٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا رطوبت اضافی آن خشک شده، بتوان از آن‌ها استفاده نمود. در مرحله بعد این دیسک‌ها به

فواصل مشخص و معینی از همدیگر در سطح محیط کشت سابورودکستروز آگار قرار داده شد. ابتدا از نمونه سوسپانسیون قارچی به میزان ۵۰ لاندا در تمام سطح محیط کشت سابورودکستروز آگار به صورت فشرده به وسیله سوآپ کشت داده و در فواصل معینی دیسک‌ها را قرار داده و در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت چند روز انکوبه نموده، بعد از مدت انکوباسیون ایجاد یا عدم ایجاد هاله ممانعت از رشد قارچ در اطراف دیسک بررسی شدند. این عمل سه بار تکرار شد.

روش چاهک

از آنجایی که در روش دیسک محدودیت در مقادیر عصاره وجود دارد و جهت بکار بردن مقادیر بیشتر عصاره از روش چاهک استفاده شد. برای تعیین حساسیت مخمر به روش چاهک برای عصاره‌ها (آبی، متانلی و اتانلی) ابتدا در محیط کشت سابورودکستروز آگار چاهک‌هایی ایجاد نموده و سپس از سوسپانسیون قارچی تهیه شده به مقدار ۱۰ لاندا روی محیط کشت اضافه کرده و به وسیله سواپ استریل در تمام جهات به صورت متراکم فشرده کاملا کشت داده و به مدت نیم ساعت در انکوباتور قرار داده و بعد با سمپلرهای مناسب برای تمامی عصاره‌ها بطور مشابه مقادیر ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰ لاندا از عصاره (آبی، متانلی و اتانلی) وارد چاهک‌ها نموده و سپس پلیت‌ها را در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چند روز در انکوباتور قرار داده و بعد از این مدت ایجاد یا عدم ایجاد هاله ممانعت از رشد قارچ در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

آنالیز آماری

پس از اینکه تمامی تست‌های فوق سه بار تکرار شدند بر روی تمامی نتایج با نرم‌افزار SPSS با آزمون T Student تجزیه و تحلیل آماری صورت گرفت. داده‌ها از هر آزمون بصورت میانگین± انحراف معیار(SD) بیان شدند. برای مقایسه گروه‌ها از آنالیز واریانس ANOVA استفاده شد.

نتایج:

در این بررسی عصاره‌های آبی، اتانلی و متانلی هسته انگور و چای سیاه بر روی قارچ مالاسزیا پاکی درمایتیس به روش‌های دیسک، چاهک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) مورد مطالعه قرار گرفتند و با داروی کلوتریمازول مقایسه گردید.

تست تعیین حساسیت قارچ مالاسزیا پاکی درماتیس به عصاره‌های آبی، اتانلی و متانلی هسته انگور به روش دیسک، چاهک و تعیین MIC و MFC و مقایسه آن با داروی کلوتریمازول

در تمامی عصاره‌ها یک روند افزایشی در هاله عدم رشد با افزایش حجم عصاره‌های مصرفی مشاهده شد و حجم ۴۰ لاندا کمترین هاله را بطور معنی‌داری نشان داد. در عصاره اتانولی و متانولی اثرات مشابهی مشاهده شد به نحوی که تنها تفاوت معنی‌دار بین حجم ۴۰ و ۷۰ مشاهده شدند و بقیه حجم‌ها تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند. در کلوتریمازول نیز تفاوت معنی‌داری در هاله عدم رشد بین غلظت‌های مختلف مشاهده شد به نحوی که کمترین هاله برای حجم ۴۰ مشاهده شد (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف هسته انگور و دارو بر مالاسزیا پاکی درمایتیس به روش دیسک.

عصاره	۴۰ لاندا	۵۰ لاندا	۶۰ لاندا	۷۰ لاندا	p-Value
اتانلی	۱۴,۶۷±۰/۵۸ ^{a}	۱۵,۶۷±۱/۱۵ ^{a,b}	۱۶,۶۷±۱/۵۳ ^{a,b}	۱۸,۶۷±۱/۵۳ ^{b}	۰/۰۲۴
متانلی	۱۴,۰۰±۱/۰۰ ^{a}	۱۵,۳۳±۱/۵۳ ^{a,b}	۱۶,۰۰±۱/۷۳ ^{a,b}	۱۸,۳۳±۱/۵۳ ^{b}	۰/۰۳۸
آبی	۱۰,۳۳±۰/۵۸ ^{a}	۱۴,۰۰±۰/۰۰ ^{b}	۱۶,۳۳±۱/۵۳ ^{b,c}	۱۹,۰۰±۱/۷۳ ^{c}	<۰/۰۰۱
کلوتریمازول	۳۵,۰۰±۲/۰۰ ^{a}	۳۸,۶۷±۱/۵۳ ^{a,b}	۴۲,۶۷±۲/۰۸ ^{b,c}	۴۷,۳۳±۲/۳۱ ^{c}	<۰/۰۰۱

a,b,c: در هر ستون میانگین‌های حداقل غلظت بازدارندگی که دارای حروف مشترک هستند بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی داری ندارند.

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف هسته انگور و دارو بر مالاسزیا پاکی درمایتیس به روش چاهک

عصاره	۸۰ لاندا	۹۰ لاندا	۱۰۰ لاندا	۱۱۰ لاندا	p-Value
اتانلی	۱۳/۰۰±۲/۶۵	۱۵/۳۳±۲/۵۲	۱۶/۶۷±۲/۸۹	۱۸/۰۰±۲/۶۵	۰/۲۱۸
متانلی	۱۲/۶۷±۲/۰۸	۱۳/۶۷±۱/۵۳	۱۴/۶۷±۲/۰۸	۱۷/۰۰±۲/۶۵	۰/۱۵۴
آبی	۱۲/۶۷±۲/۰۸ [a]	۱۴/۶۷±۱/۱۵ [a,b]	۱۶/۶۷±۱/۵۳ [a,b]	۱۹/۰۰±۲/۶۵ [b]	۰/۰۲۱
کلوتریمازول	۴۰/۰۰±۱/۰۰ [a]	۴۳/۶۷±۱/۵۳ [b]	۴۵/۶۷±۱/۵۳ [b]	۴۹/۳۳±۱/۱۵ [c]	<۰/۰۰۱

هالـــه عدم رشـــد در عصاره‌های اتانلـــی و نیز متانلی تفاوت معنـــی‌داری را در غلظت‌های مختلف نشـــان نداد. به عبـــارت دیگر تمام غلظت‌ها اثر یکســـانی داشـــتند، ولی در عصاره آبی افزایش معنی‌داری در هاله عدم رشـــد بین غلظت ۱۱۰ و ۸۰ مشـــاهده شـــد. در مقایســـه با کلوتریمازول هاله عدم رشـــد کوچکتری ظاهر شـــدند (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار مقادیر عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی هسته انگور بر مالاسزیا پاکی درمایتیس در تعیین MIC و MFC (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر).

	آبی	اتانول	متانول	p-Value
MIC	۱۲۵۰/۰۰±۰/۰۰ [a]	۱۲۵۰/۰۰±۰/۰۰ [a]	۳۳۳۳۳/۰۰±۱۴۴۳۳/۷۶ [b]	۰/۰۳۴
MFC	۱۶۶۶۷/۰۰±۷۲۱۶/۸۷ [a]	۱۲۵۰۰/۰۰±۰/۰۰ [a]	۲۳۶۱۱/۰۰±۱۴۴۳۳/۷۶ [a]	۰/۰۱۷

MIC و MFC عصـــاره آبـــی و اتانولی تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشـــتند ولی در مقایســـه با عصاره متانولـــی بطور معنی‌داری کمتر بودند.

تعیین حساسیت قارچ مالاسزیا پاکی درماتیس به عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی چای سیاه به روش دیسک، چاهک و تعیین MIC و MFC

در اطراف دیسک و چاهک از عصاره های آبی چای سیاه، در هر سه تکرار، هاله عدم رشد دیده نشد (جدول ٤).

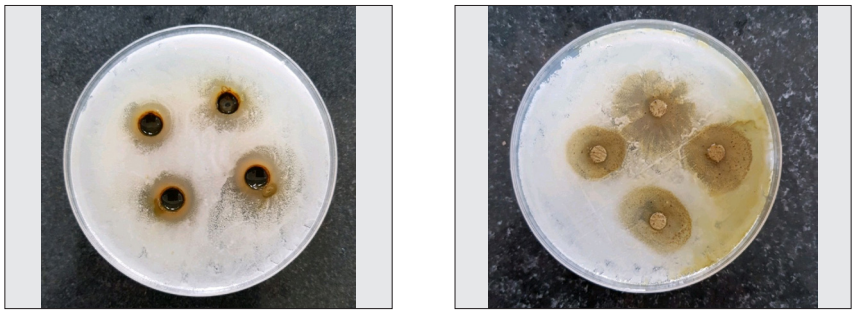
جدول ٤- میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف چای سیاه بر مالاسزیا پاکی درمایتیس به روش دیسک (بر حسب میلی‌متر).

عصاره	اتانولی	متانلی	آبی	p-Value
٤٠ لاندا	۱۵/۶۷±۱/۵۳	۱۴/۰۰±۰/۰۰	-	۰/۱۳۲
٥٠ لاندا	۱۷/۳۳±۱/۱۵	۱۵/۳۳±۰/۵۸	-	۰/۰۵۵
٦٠ لاندا	۱۹/۳۳±۱/۱۵	۱۶/۰۰±۰/۰۰	-	۰/۰۳۸
٧٠ لاندا	۲۲/۰۰±۱/۷۳	۱۸/۶۷±۱/۱۵	-	۰/۰۵۰

آنالیـــز آماری با آزمون تی‌تســـت برای مقایســـه تفاوت بیـــن حجم‌هـــای ٥٠، ٦٠ و ٧٠ از عصاره اتانلـــی هاله عدم رشـــد بزرگتری را در مقایســـه با عصاره متانلی نشـــان داد. آنالیـــز آماری با آزمـــون ANOVA تفاوت معنـــی‌داری را بین حجم‌های مختلف عصـــاره اتانولی نشـــان داد (p=۰,۰۰۱). حجـــم ٤٠ کمتریـــن هاله را در مقایســـه با بقیه حجم‌ها نشـــان داد. در عصاره اتانلی بین حجم‌هـــای ٤٠ و ٥٠ و ٦٠ میکرولیـــتر هاله عدم رشـــد تفاوت معنی‌داری نشـــان نداد.

جدول ۵- میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد عصاره‌های مختلف چای سیاه بر مالاسزیا پاکی درمایتیس به روش چاهک (برحسب میلی‌متر).

عصاره	اتانول	متانل	آبی	p-Value
۸۰ لاندا	۱۵/۶۷±۱/۵۳	۱۲/۳۳±۰/۵۸	-	۰/۰۲۴
۹۰ لاندا	۱۶/۰۰±۲/۰۰	۱۳/۰۰±۰/۰۰	-	۰/۰۶۰
۱۰۰ لاندا	۱۷/۰۰±۱/۷۳	۱۴/۰۰±۰/۰۰	-	۰/۰۹۵
۱۱۰ لاندا	۱۸/۰۰±۲/۰۰	۱۵/۶۷±۰/۵۸	-	۰/۱۲۴



شکل ۱- تست تعیین حساسیت قارچ مالاسزیا پاکی درماتیس به عصاره‌های چای سیاه به روش‌های دیسک و چاهک.

براساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری و آزمون واریانس یک طرفه در روش چاهک هاله عدم رشد تفاوت معنی‌داری را بین دو نوع عصاره تنها در رقت ۸۰ نشان داد. به نحوی که عصاره اتانولی بطور معنی داری هاله عدم رشد بزرگتری را در مقایسه با عصاره متانولی نشان داد.

جدول ۶- میانگین و انحراف معیار مقادیر عصاره‌های آبی، متانلی و اتانلی چای سیاه بر مالاسزیا پاکی درمایتیس در تعیین MIC و MFC (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر).

	آبی	متانلی	اتانولی	p-Value
MIC	۳۳۳۳۳/۳۳±۱۴۴۳۳/۷۶	۹۳۷۵/۰۰±۵۴۱۲/۶۶	۶۲۵۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۱۹
MFC	-	۱۸۷۵۰/۰۰±۱۰۸۲۵/۳۲	۱۲۵۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۲۷

براساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری و آزمون واریانس یک طرفه در MIC تفاوت معنی‌داری بین سه نوع عصاره و در MFC تفاوت معناداری بین دو نوع عصاره مشاهده شدند. بطور کلی عصاره‌های این دو گیاه دارای اثر ضدمالاسه‌زیایی قابل دسترس و طبیعی آنتی بیوتیکی هستند ولی در مقایسه با کلوتریمازول هاله عدم رشد کوچکتری ظاهر شدند. با این وجود فعالیت ضدمالاسه‌زیایی عصاره‌های هسته انگور بیش از چای سیاه می‌باشد.

بحث:

استفاده گسترده از عوامل ضدقارچی و متعاقب آن، ظهور مقاومت دارویی، یک پدیده شایع و بعنوان یک مشکل عمده مطرح می‌شود. به همین دلیل برخی مطالعات با هدف تولید داروهای گیاهی در حال انجام است. با توجه به بیماری‌هایی که مخمر مالاسه زیاپاکی درمایتیس برای انسان و حیوانات ایجاد می‌کند، مهار رشد و تکثیر این قارچ می‌تواند کمک شایانی به بهداشت و سلامتی جامعه

انسانی و حیوانی نماید. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند اطلاعات پایه‌ای در زمینه کارایی و اثربخشی عصاره‌های مختلف هسته انگور و چای سیاه به منظور کاهش رشد این مخمر و فعالیت ضدقارچی در اختیار قرار دهد. مطالعاتی در زمینه فعالیت ضدقارچی هسته انگور و چای سیاه توسط محققین انجام گرفته است: Eslami و همکاران اثر عصاره دانه انگور را روی Candida glabrata و Candida krusei بررسی کردند که با روش انتشار چاهک در غلظت µg/ml ۵۰ به ترتیب قطر هاله عدم رشد ۱۰ و ۹ میلی متر و در غلظت µg/ml ۱۰۰ به ترتیب ۱۱ و ۱۵ میلی متر گزارش کردند (۲۶) که با مطالعه ما مطابقت داشت. فعالیت ضد کاندیدایی عصاره هسته انگور در مدل موش‌های مبتلا به کاندیدیازیس واژن (با MIC ۳۲ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر)نشان داده شده است (۲۱). Tsutsumi و همکاران فعالیت ضد قارچی عصاره هسته انگور را در مقایسه با فلوکونازول روی گونه‌های کاندیدا بررسی کردند. MIC عصاره هسته انگور برای C. tropicalis ، C.glabrata ، C.albicans و C. parapsilosis به ترتیب ۱۹/۵، ۱۹/۵، ۹/۷ و ۱۹/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. در صورتی که MIC فلوکونازول به ترتیب برای این گونه‌ها ۵، ۵، ۵ و ۰/۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. حدود میزان MIC و MFC عصاره هسته انگور و فلوکونازول روی گونه‌های کاندیدا به ترتیب ۹/۷ تا ۳۹ میکروگرم بر میلی لیتر و ۰/۳۱ تا ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد (۲۲) که برخلاف مطالعه ما اثر عصاره هسته انگور روی گونه‌های کاندیدا بیشتر از مالاسزیا می‌باشد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ که توسط Ranjitha و همکارانش انجام شد فعالیت ضد میکروبی عصاره هسته انگور (GSE) بررسی شد. استافیلوکوکوس اورئوس و E. coli به ترتیب به میزان زیاد و کم توسط عصاره هسته انگور مهار شدند (۲۳). Yadegari و همکاران (۱۳۸۸) اثر ضد قارچی پلی فنل‌های برگ سبز چای و فلوکونازول بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت را بررسی کردند. فلوکونازول در رقت‌های مختلف تأثیری بر کاندیدا آلبیکنس نداشت؛ بنابراین این سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس، مقاوم به فلوکونازول اعلام شد در حالی که کاتشین اثر مهارکنندگی بر رشد مخمر داشت. همچنین فعالیت ضد قارچی کاتشین وابسته به زمان بود به طوری که میزان مهارکنندگی از رشد این ترکیب پلی فنلی پس از زمان ۴۸ ساعت بیشتر از ۲۴ ساعت بود (۲۴). Ghaemi و همکاران (۱۳۸۷) به مطالعه اثر مهارکنندگی عصاره‌های اتیل استاتی چای سبز و سیاه بر هلیکوباکتر پیلوری عامل زخمهای معده پرداختند. در این تحقیق اثر چای سبز بر هلیکوباکتر پیلوری و ممانعت از تولید و فعالیت اوره آز توسط آن، بیشتر از چای سیاه بود (۲۵). Ghouila و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کرده‌اند که عصاره هسته انگور دارای اثرات آنتی‌اکسیدان، ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد و حساسیت برخی گونه‌های باکتریایی را نسبت به عصاره هسته انگور در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد (۲۶). Simonetti و همکارانش (۲۰۱۶) فعالیت ضد درماتوفیت (با MIC ۲۰ تا ۹۷ µg/ml) و ضد مالاسزیا (با MIC ۳۲ تا ۱۶۱ µg/ml) عصاره‌های هسته‌ی انگور را نشان دادند (۲۷). Khalji و Nistani (۱۳۸۵) به مطالعه اثر مهاری چای سبز و سیاه بر روی رشد E. coli پرداختند که عصاره‌های چای سیاه و سبز به طور انتخابی و وابسته به دوز روی آنتی بیوتیک‌ها اثرات هم افزاینده یا مهاری داشتند (۲۸). Parvez و همکاران (۲۰۱۹) اثر عصاره خام چای سبز روی E. coli و استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند دارو را با MIC به ترتیب ۱۲۵۰ و ۶۲۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش کردند (۱). Akroum عصاره چای خام را روی گونه‌های کاندیدا و میکروسپوروم پرسی کالر اثر داد و کاندیدا کروزی بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره آبی چای داشت (۵). Anita و همکاران (۲۰۱۵) میانگین قطر هاله ممانعت از رشد، ۳۰ میکرولیتر محتوی ۳۰۰ میکروگرم عصاره اتانولی چای سبز روی استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را به ترتیب ۱۸ و ۱۴ گزارش کردند (۲۹). Ashrafpour و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که عصاره‌های کلراید متیلن هر دو نوع چای سبز و سیاه فعالیت ضد کاندیدا آلبیکنس بیشتری نسبت به عصاره‌های متانولی داشتند و قطر هاله ممانعت از رشد برای عصاره کلراید متیلن چای سبز و سیاه به ترتیب ۳۰ و ۳۴ میلی متر در مقایسه با ۲۰ میلی متر نیستاتین بودند(۳۰).

نتیجه‌گیری:

با توجه به مطالعه انجام شده اخیر، عصاره هسته انگور (GSE) و چای سیاه دارای مزایایی مانند قیمت پایین، در دسترس بودن، طعم مناسب به جای داروی کلوتریمازول، پس از آزمایش بالینی مفید باشند. اگر چه با توجه به مطالعه ما قدرت جلوگیری از رشد و کشندگی عصاره هسته انگور و چای سیاه به‌اندازه دارویی مانند کلوتریمازول نیست اما بهتر است که اثر سینرژیکی آن‌ها بررسی شده تا بتوان تا حد امکان از غلظت داروهای شیمیایی در طول درمان کم کرد.

تقدیر و تشکر:

از همه کسانی که محققین این پژوهش را یاری رسانده‌اند سپاسگزاریم.

تعارض منافع:

نویسندگان تعارض منافعی را گزارش نکردند.

References

1. Parvez MA, Saha K, Rahman J, Munmun RA, Rahman MA, Dey SK, Rahman MS, Islam S, Shariare MH. Antibacterial activities of green tea crude extracts and synergistic effects of epigallocatechingallate (EGCG) with gentamicin against MDR pathogens. Heliyon. 7)5;2019):e02126. **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02126

2. Safari MR, Azizi O, Heidary SS, Kheiripour N, Ravan AP. Antiglycation and antioxidant activity of four Iranian medical plant extracts. Journal of pharmacopuncture. 82:(2)21 ;2018. **DOI:** https://doi.org/10.3831/kpi.2018.21.010

3. Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. Journal of ethnopharmacology. 38-29:(3-1)51;1996. **DOI:** https://doi.org/4-01347(95)8741-0378/10.1016

4. La Barre W. Twenty years of peyote studies. Current Anthropology. 60-45:(1)1;1960. **DOI:** https://doi.org/200075/10.1086

5. Akroum S. Antifungal activity of Camellia sinensis crude extracts against four species of Candida and Microsporum persicolor. Journal de mycologie medicale. 7-424:(3)28;2018. **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.06.003

6. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews. 82-564:(4)12;1999. **DOI:** https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564

7. Bannerman RH, Burton J, Wen-Chieh C. Traditional medicine and health care coverage; a reader for health administrators and practitioners.

Geneva : World Health Organization. 1983. **DOI:** https://doi.org/10.53738/revmed.2017.13.564.1128

8. Huang JJ, Yu H, Hong G, Cheng H, Zheng M. Antifungal effect of tea extracts on Candida albicans. Dental materials journal. 9-664:(4)39 ;2020. **DOI:** https://doi.org/10.4012/dmj.014-2019

9. Wang Y, Bandara HM, Mikkelsen D, Samaranayake LP. Effects of tea extracts on the colonization behaviour of Candida species: attachment inhibition and biofilm enhancement. Journal of Medical Microbiology. 52-1244:(8)66 ;2017. **DOI:** https://doi.org/10.1099/jmm.0.000555

10. Simonetti G, Brasili E, Pasqua G. Antifungal activity of phenolic and polyphenolic compounds from different matrices of Vitis vinifera L. against human pathogens. Molecules. 3748:(16)25 ;2020. **DOI:** https://doi.org/10.3390/molecules25163748

11. Sano A, Uchida R, Saito M, Shioya N, Komori Y, Tho Y, Hashizume N. Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. Journal of nutritional science and vitaminology. -174:(2)53;2007 82. **DOI:** https://doi.org/10.3177/jnsv.53.174

12. Camargo LE, Pedroso LS, Vendrame SC, Mainardes RM, Khalil NM. Antioxidant and antifungal activities of Camellia sinensis (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. Brazilian Journal of Biology. 34-428:(76)15 ;2016. **DOI:** https://doi.org/6984.18814-1519/10.1590

13. Luther M, Parry J, Moore J, Meng J, Zhang Y, Cheng Z, Yu LL. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. Food Chemistry. 73-1065:(3)104 ;2007. **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.034

14. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. International journal of molecular sciences. 46-622:(2)11;2010. **DOI:** https://doi.org/10.3390/ijms11020622

References

15. Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks Jr JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Safety assessment of Vitis vinifera (Grape)-derived ingredients as used in cosmetics. International journal of toxicology. 3)33 ;2014_suppl):48S83-S. **DOI:** https://doi.org/1091581814545247/10.1177

16. Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. PLoS pathogens. 1)11 ;2015):e1004523. **DOI:** https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004523

17. Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, de los Ángeles Sosa M, Diez GO, Espada CM, Payá MJ, Giusiano G. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against M alassezia species. Mycoses. 5-571:(5)56;2013. **DOI:** https://doi.org/10.1111/myc.12076

18. Lee JH, Lee JS. Inhibitory effect of plant essential oils on Malassezia pachydermatis. Journal of Applied Biological Chemistry. 8-184:(3)53;2010. **DOI:** https://doi.org/10.3839/jabc.2010.033

19. Simonetti G, Santamaria AR, D'Auria FD, Mulinacci N, Innocenti M, Cecchini F, Pericolini E, Gabrielli E, Panella S, Antonacci D, Palamara AT. Evaluation of anti-Candida activity of Vitis vinifera L. seed extracts obtained from wine and table cultivars. BioMed research international. 2014 ;2014 , Article ID 127021. **DOI:** https://doi.org/127021/2014/10.1155

20. Kara Z, Baykan M, Doğan M, Ege D. Effectiveness of grape (Vitis vinifera L.) seed extracts on fungi and bacteria management. Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences. 72-366:(3)32; 2018. **DOI:** https://doi.org/10.15316/sjafs.2018.108

21. Eslami H, Babaei H, Mehrbani SP, Aghazadeh M, Babaei Z, Nezhad SK. Evaluation of antifungal effect of grape seed extract (GSE) on Candida glabrata and Candida krusei: in vitro study. Biomedical Research (India). 70-9163:(21)28;2017. **DOI:** https://doi.org/10.5005/jp-journals2167-10024-

22. Tsutsumi-Arai C, Terada-Ito C, Tatehara S, Imamura T, Takebe Y, Ide S, Satomura K. Fungicidal activity of grapefruit seed extract against the pathogenic Candida species causing oral candidiasis. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 32-626:(6)33;2021. **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2021.03.001

23. Ranjitha CY, Priyanka S, Deepika R, Smitha Rani GP, Sahana J, Prashith Kekuda TR. Antimicrobial activity of grape seed extract. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 8-1483:(8)3;2014. **DOI:** https://doi.org/10.22270/jddt.v8i6.2003

24. Yadegari MH, Nasrollahi Z, Moazeni SM. Antifungal effect of green tea leaf (Camellia sinensis) polyphenols on Candida albicans. Pathobiology Research. 7-71:(3)12 ;2009.

25. Ghaemi A, Mohmmadi I, Shoae Hassani A, Hamdi K, Ordouzadeh N. Inhibitory Effect of Green and Black Teas Ethyl acetate extracts on Helicobacter pylori the causative agent of peptic ulcers. Journal of Inflammatory Diseases. 8-12:(4)13 ;2010. **DOI:** https://doi.org/10.1007/s6-9314-008-00284

26. Ghouila Z, Laurent S, Boutry S, Vander Elst L, Nateche F, Muller RN, Baaliouamer A. Antioxidant, antibacterial and cell toxicity effects of polyphenols Fromahmeur bouamer grape seed extracts. Journal of Fundamental and Applied Sciences. -392:(1)9 ;2017 420. **DOI:** https://doi.org/10.4314/jfas.v9i1.24

27. Simonetti G, D'Auria FD, Mulinacci N, Innocenti M, Antonacci D, Angiolella L, Santamaria AR, Valletta A, Donati L, Pasqua G. Anti-Dermatophyte and Anti-Malassezia Activity of Extracts Rich in Polymeric Flavan-3-ols Obtained from Vitis vinifera Seeds. Phytotherapy Research. 31-124:(1)31 ;2017. **DOI:** https://doi.org/10.1002/ptr.5739

28. Khalji N, Nistani T. The study of the inhibitory effect of black tea and green tea (Camellia sinensis) on the growth of pathogenic Escherichia coli bacteria in a laboratory environment (invitro). Journal of Nutrition Sciences and Food Industries of Iran. – 33 :(1)3 ;2006 38. **DOI:** https://doi.org/1.4953496/10.1063

29. Anita P, Sivasamy S, Kumar PM, Balan IN, Ethiraj S. In vitro antibacterial activity of Camellia sinensis extract against cariogenic microorganisms. Journal of basic and clinical pharmacy. 35:(1)6;2014. **DOI:** https://doi.org/0105.145777-0976/10.4103

30. Ashrafpour M, Ghorbani AR, Sefidgar AA, Kazemi HH, Moghadamnia AA, Kazemi S, Mazleghani M, Baradaran M. The Comparison of Antifungal Effects of Methylene Chloride and Methanol Extracts of Green and Black Tea on Candida albicans. Journal Babol University Medical Science60-53:(5)18 ;2016. **DOI:** https://doi.org/10.30699/jidai.31.1.2