تاثير المستخلص المائي لنبات الشاي الاخضر *Camellia sinensis* على بكتريا *Staphylococcus* spp.

اسامة باسم الصفار*- أيوب مرتضى الشيخ فخري**
**ayoobov@gmail.com *osamaalsaffar@gmail.com
قسم علوم الحياة - كلية مدينة العلم الجامعة - بغداد، العراق

الخلاصة

أجريت الدراسة على نبات الشاي الاخضر *Camellia sinensis* لمعرفة فعالية المستخلص المائي للنبات في نمو البكتريا *Staphylococcus* spp. أظهر المستخلص فعالية جيدة ضد البكتريا *S. aureus* و *S. epidermidis* حيث سجلت اعلى تثبيط عند تركيز 20 ملغم/مل بلغ 21.00 و23,00 ملم والذي لم يفرق معنوياً عن قطر التثبيت عند تركيز 10 ملغم/مل للنوعين *S.aureus* و *S.epidermidis* وعلى التوالي. باستخدام طريقة الأنتشار في الحفر(Agar well diffusion method) قورنت هذه النتائج مع تأثير بعض المضادات الحيوية المعروفة مثل : Ceftriaxone و Amoxicillin و Gentamicin. اعطت اقطار تثبيط بلغت 7.00 و4.00 و10.00 ملم لبكتريا *S. aureus* 9.00 و5.00 و13.00 ملم للبكتريا *S. epidermidis*. بينت النتائج ان قيم MIC للمضادات الثلاثة Ceftriaxone ، و Amoxicillin و Gentamicin كانت 8.00 و16.00 و 5.00 ملغم/مل و 6.00 و 10.00 و 3.00 ملغم/مل لبكتريا *S. aureus* و *S. epidermidis* بالتعاقب.

Effect of aqueous extract of green tea *Camellia sinensis* against bacteria *Staphylococcus* spp.

*osamaalsaffar@gmail.com **ayoobov@gmail.com
Osama Bassim Al-Saffar – Ayoob Murtadha Al-Shiekh-Faqri
Madenat Al-alem Univ. College, Biology Dept., Al-Kadhmiya, Baghdad, Iraq

Abstract

This study was conducted on green tea *Camellia sinensis* to determine the inhibition activity of plant aqueous extract against bacteria *Staphylococcus* spp.; The extract showed good inhibitory activity against *S. aureus* and *S. epidermidis* with 21.00 and 23.00 mm at 20 mg/mL, respectively with no significant differences with that of 10 mg/mL. The results compared to that of Ceftriaxone , Amoxicillin and Gentamicin antibiotics using agar well diffusion technique. The inhibition zone *S.aureus* was 10.00, 4.00, 7.00 mm for antibiotics Ceftriaxone , Amoxicillin and Gentamicin while *S.epidermidis* was 13.00, 5.00, 9.00 mm. The MIC results showed for the antibiotics ceftriaxone , Amoxicillin and Gentamicin which 8.00, 16.00, 5.00 and 6.00, 10.00, 3.00 mg/mL for *S.aureus* , *S.epidermidis* respectively.

Key words: green tea *(Camellia sinensis*), aqueous extract, Bacteria

المقدمة

الشاي الاخضر نبات دائم الخضرة، ينسب إلى فصيلة الكاميلية Theaceae ، ان موطن النبات لأصلي شرقي آسيا، ينمو في موطنه إلى ارتفاع 9 أمتار، ولكنه في المزارع يقلم شجيرات صغيرة طولها 90- 150 سم (1). أوراقه رمحية الشكل خضراء داكنة، والأزهار عطرة بيضاءمصفرة (2).

.الشاي الاخضر أكتشفه الصينيون قبل نحو خمسة آلاف سنة (3). أوراقه من نفس أوراق نبات الشاي الأسود *Camellia sinensis* والاختلاف في طريقة التصنيع فقط. حيث أن الشاي الأخضر يجفف سريعا بالبخار بينما الشاي الأسود تفرم الأوراق وتعجن وتتخمر ثم تجفف ولهذا تحتوي على نسبة عالية من مادة التاينين (2,3).

أوراق الشاي الأخضر غير المخمرة تظل موادها كما هي، ويستخدم الشاي الأخضر كعلاج للصداع النصفي وله بعض الفوائد للأسنان لوجود مادة الفلورايد (4). الذي يساعد علي احتراق الدهون بالجسم وينظم سكر الدم ومعدل هرمون الإنسولين(5). وبعض الناس يضع أكياس الشاي الأخضر بعد غليها على الجيوب تحت العين حيث يمكن أن تعالج الانتفاخ، ويمكن أن يستخدم كحمام يرش فوق الجلد ليلطفه من حروق الشمس أو تلطف لدغات الناموس والحشرات (6).

المكونات الكيميائية Chemical constituents

يتميز بمكونات عدة وهي :

الفينولات Phenols: تعزى الخواص الصحية المفيدة للشاي الأخضر، وبدرجة أقل غالباً للشاي الأسود، ويعتبر مضاد الأكسدة Antioxidant Polyphenols، التي يزيد تأثيرها كثيراً عن تأثير حمض الأسكوربيك أو فيتامين Vitamin C وهي التي تعطي الشاي طعمه المر (1).

تصنف متعددات الفينولات الموجودة في أنواع الشاي بأنها Catechins. أشار Gramza and Korczak، (2005) أن الشاي الأخضر يحتوي على مركبات أولية اهمها:

- Gallocatechin
- Epicatechin
- Epigallocatechin
- Epicatechin Gallate
- Epigallocatechyn Gallate

يحتوي الشاي أيضاً ألقالويدات او ألكالوئيدات Alkaloids مثل الكافئين Caffeine وايضاً الثيوبرومين Theobromine وكذلك والثيوفيلين Theophylline. تعطي هذه الألكالويدات الشاي خواصه المنبهة (7).

ويحتوي الشاي الأخضر أيضاً الحامض الأميني L-Theanine الذي يعطيه تأثيره المهدئ للجهاز العصبي (8).

يحتوي الشاي كذلك على حمض الأسكوربيك Ascorbic Acid ، ومعادن مختلفة مثل الكروم والمنغنيز والسيلينيوم والزنك(9).

الشاي الأخضر هو مضاد أكسدة أقوى من الشاي الأسود. لكن الشاي الأسود يحوي مواد لا توجد في الشاي الأخضر مثل Theaflavin(10).

تهدف الدراسة الى :-

1- دراسة تأثير المستخلص المائي للشاي الأخضر ضد بكتريا *S. aureus* و *S. epidermides*.
2- إجراء اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية لمعرفة مقاومتها للمضادات المستعملة ومقارنتها بالمستخلص النباتي المائي.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات نبات الشاي الاخضر Camellia sinensis وتشخيصه

جمعت العينات النباتية من محلات بيع الأعشاب في الاسواق العراقية. ونقلت إلى المختبر وطحن النبات وحفظت في عبوات زجاجية معتمة محكمة الغلق. تم تشخيص النبات في معشب كلية العلوم ، جامعة بغداد.

عزلات البكتريا

أجريت هذه الدراسة على عزلات بكتريا *Staphylococcus* spp. التي تم الحصول عليها من مختبرات الصحة المركزية- وزارة الصحة، وهي مشخصة من قبل المركز البحثي (جدول 1).

حساب العدد التقريبي للبكتريا

تم حساب العدد التقريبي للعزلات قيد الأختبار، بنقل كمية مناسبة من المستعمرات من المزارع النقية المنشطة للكائن المجهري إلى أنابيب حاوية على محلول الملح الفسيولوجي بحيث تصبح العكورة مساوية لعكورة محلول ثابت العكورة (11). وللدقة تقاس الكثافة الضوئية لكل من العالق ومحلول ثابت العكورة عند طول موجي

650nm وتقارن لغرض الحصول على عدد تقريبي للكائن المجهري وبتركيز (8x101.5) خلية/مل .

حفظ وإدامة العزلات Maintenance of isolates

أستعمل وسط Brain heart infusion بشكل Slant لحفظ العزلات في درجة حرارة (4)°م، ويتم تجديد المزارع كل 3-4 أسابيع.

المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة

حضرت التراكيز المطلوبة بإذابة المضادات الحيوية في المذيب الخاص لكل مضاد، ثم عقمت بالترشيح بإستخدام المرشحات الغشائية (Millipore membrane filter) قطر فتحاتها (0.22) مايكروميتر، والمبينة أنواعها وتراكيزها بالمايكروغرام/مل ورمزها في الجدول 2 (12).

تحضير المستخلص المائي النباتي

تم تحضير المستخلص النباتي حسب طريقة Gramza, (2004) وذلك باخذ 100 غرام من أوراق الشاي الأخضر ووضعها في 1000 مل ماء مغلي ولمدة 15 دقيقة ، ومن ثم نقلها ال جهاز الطرد المركزي بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك يرشح بواسطة Filtration ويجفف تحت ضغط.

حضر محلول خزين (Stock solution) من المستخلص النباتي وذلك بإذابة 1 غم من المستخلص المجفف في 10 مل من الماء، وعقم خلال ورقة الترشيح 0.22 مايكروميتر ، وحضرت التراكيز 0.1 ، 0.5 ، 1 ، 5 ، 10 ، 20 ملغم/مل وذلك بمزج حجم معين من محلول الخزين مع الماء للحصول على التراكيز المطلوبة.

تأثير التراكيز المختلفة لمستخلص النبات المائي في نمو البكتريا

1- طريقة الأنتشار في الحفر The agar-well diffusion method

أجريت دراسة تأثير مستخلص النبات على البكتريا بأستخدام طريقة الأنتشار في الحفر ، وحددت مدة القراءة للنتائج بعد (24) ساعة بوساطة قياس أقطار مناطق التثبيط (Inhibition Zones)أتبعت طريقة Perez *et al.* (1990) للكشف عن فعالية التراكيز المختلفة للمستخلص المائي والمضادات الحياتية وكما يلي:

1- لقح وسط الأكار المغذي بنشر 0.1 مل بوساطة ناشرمعقم (Sterile spreader) من مزروع البكتريا الحاوي على 8x 101.5 خلية/مل، بمقارنته مع محلول ثابت العكورة القياسي، ثم تركت الأطباق لتجف في حرارة الغرفة .

2- عملت حفر بقطر 10 ملم في الوسط المزروع بوساطة ثاقب فليني معقم (Sterile cork borer)

3- أضيف مقدار 0.2 مل من التراكيز المتدرجة المحضرة للمستخلص النباتية بإستعمال ماصة دقيقة معقمة وعملت حفرة السيطرة المتمثلة بأضافة الماء.

4- عملت ثلاث مكررات لكل طبق ، بعدها حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة في الحاضنة .

5- حددت فعالية كل تركيز من المستخلص النباتي بقياس قطر منطقةالتثبيط (Inhibition zone).

2- تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلص النباتي المائي و المضادات

1- حضرت سلسلة من التخافيف المتدرجة للمستخلص النباتي المائي بأستخدام وسط Nutrient broth تراوحت قيمها 0.1 ، 0.5 ، 1 ، 5 ، 10 و 20 ملغم/مل .

2- لقحت الأنابيب بمقدار 0.1 مل من مزرعة البكترية بعمر 24 ساعة حاوية على 8x101.5 خلية/مل، ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة .

3- قورنت النتائج مع معاملي السيطرة 1 و 2 المتمثلة بوسط زرعي ملقح بالبكتريا والوسط الزرعي مع المستخلص النباتي فقط.

4- حددت قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) بأنها أقل تركيز من المستخلص الذي يمنع حدوث عكورة واضحة للعين المجردة في الوسط الزرعي حسب ماجاء في (2002) NCCLS.

أستخدم البرنامج الأحصائي SPSS لتحليل النتائج.

النتائج والمناقشة

إختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية

أشارت النتائج الى مقاومة نسبية لمعظم عزلات البكتريا قيد الدراسة لأغلب المضادات الحيوية المستعملة. حيث اعطت بكتريا *Staphylococcus aureus* اقطار تثبيط 7.00 و4.00 و10.00 ملم وبكتريا *Staphylococcus epidermidis* كانت 9.00 و5.00 و 13.00 ملم لكل من Ceftriaxone و Amoxicillin و Gentamicin على التوالي. وهذه النتيجة من المحتمل ان تكون بسبب كثرة الأستخدام للمضادات الحيوية، فضلاً عن تطور نوع المقاومة التي تمتلكها هذه العزلات ضد أغلب المضادات المستعملة (13).

اظهرت المضادات Gentamicin Ceftriaxone، Amoxicillin فعالية نسبيا اتجاه البكتريا (جدول 3).

بينت نتائج (MIC) للمستخلص المائي والمضادات. ان المستخلص المائي قد اعطى قيم 2.00 ، 1.25 مايكروغرام لكل مل وهي قيم ذات فروق معنوية اذا ماقورنت من MIC للمضادات المستعملة والتي كانت 5.00,16.00,8.00 مايكروغرام/مل لبكتريا *S.aureus* و 3.00,10.00,6.00

مايكروغرام/مل لبكتريا *S. epidermidis* وعلى التوالي وكما مبين في الجداول 4 ، 5.

تأثير المستخلص المائي لنبات الشاي الاخضر في نمو البكتريا

اظهرت المستخلصات المائية فعالية تجاه البكتريا قد تعزى لأحتواء هذا المستخلص على أغلب المركبات الفعالة المضادة للأحياء المجهرية مثل الفينولات والتربينات والزيوت الطيارة والثيوبرومين والثيوفيلين والألكالوئيدات والكايتين والكافيين والمعادن وبعض الاحماض الامينية(14,15) .

اظهرت بكتريا *S.epidermidis* أكثر حساسية للمستخلص المائي من بكتريا *S.aureus* حيث كانت مناطق التثبيط 21.00 , 23.00 ملم على التوالي عند التركيز (20) ملغم / مل (جدول 5).

قد يعزى التأثير العالي للمستخلص الى وجود مركبات الفينول، ووجود مركبات الالكلويد، والكايتين (16) ويعود لقدرة هذه المركبات على تحليل جدار الخلية كما يؤدي الى أضعاف الفعاليات الحيوية داخل الخلية وذلك عن طريق التداخل مع وظيفة الغشاء السايتوبلازمي متمثلة بعملية بناء البروتين ومن ثم تثبيط وأيقاف هذه العملية (8,17) والزيوت الطيارة القادرة على تثبيط نمو البكتيري، باعاقة عملية النقل الفعال للأيونات والأملاح عبر هذا الغشاء (18).

الاستنتاجات

اظهر المستخلص المائي لنبات الشاي الأخضر فعالية جيدة ضد *S. aureus* و *S. epidermidis* كانت بكتريا *S.epidermidis* الأكثر تأثراً من البكتريا *S.aureus* بالمستخلص المائي للنبات. كما أظهر المستخلص المائي فعالية جيدة أفضل من فعالية المضلدات الحيوية.

جدول (1) عزلات البكتريا ومصدرها

أسم العزلة	مصدر الأصابة	مكان جمعها
Staphylococcus aureus	إلتهاب المجاري البولية، تقرحات الجلد	مختبرات الصحة المركزية
Staphylococcus epidermidis	تقرحات الجلد	مختبرات الصحة المركزية

جدول (2) المضادات الحيوية وتراكيزها والمذيب الخاص لها والمخففة

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز	المذيب	المادة المخففة
Ceftriaxone	CRO	30µg	فوسفيت بفر pH:6	فوسفيت بفر pH:6
Amoxicillin	AMC	30µg	فوسفيت بفر pH:6	فوسفيت بفر pH:6
Gentamicin	GN	10µg	ماء	ماء

جدول (3) تأثير المضادات الحيوية بوساطة قياس أقطار التثبيط (المعدل± الخطأ القياسي) في نوعين من البكتريا

المضاد	أقطار التثبيط (ملم) للبكتريا	
	S.aureus	*S.epidermidis*
Ceftriaxone	0.2±10.00	0.2±13.00
Amoxicillin	0.2±4.00	0.1±5.00
Gentamicin	0.2±7.00	0.1±9.00

جدول (4) قيم MIC للمستخلص المائي النباتي في البكتريا *Staphylococcus Spp.*

البكتريا	تركيز MIC مايكروغرام / مل للمستخلص المائي
S.aureus	2.00
S.epidermidis	1.25

جدول (5) قيم MIC للمضادات المستخدمة ضد البكتريا *Staphylococcus Spp.*

البكتريا	تركيز MIC مايكروغرام / مل		
	Ceftriaxone	*Amoxicillin*	*Gentamicin*
S.aureus	8.00	16.00	5.00
S.epidermidis	6.00	10.00	3.00

جدول (6) تأثير مستخلص المائي لنبات الشاي الاخضر بوساطة قياس أقطار (ملميتر) التثبيط في البكتريا

S.epidermidis	*S.aureus*	التركيز(ملغم/مل)
a0.0±0.0 a,B	0.0±0.0 a,B	**0.1**
b0.36±12.00 b,B	0.48±10.00 b,A	**0.5**
c0.52±15.00 c,B	0.57±12.00 c,A	**1**
d0.28±19.00 d,B	0.57±16.00 d,A	**5**
e0.31±22.00 e,B	0.37±18.00 e,A	**10**
e0.38±23.00 e,B	0.28±21.00 f,A	**20**

– معاملة السيطرة في كلا البكتريا كانت صفر

الحروف المتشابهة الصغيرة في نفس العمود يعني عدم وجود فرق معنوي بين الأعمدة (التراكيز) عند مستوى معنوية P<0.05

الحروف المتشابهة الكبيرة في نفس العمود يعني عدم وجود فرق معنوي بين الصفوف (البكتريا) عند مستوى معنوية P<0.05

المصادر

1. **Balentine** D. (1997). Tea and health. Crit Rev Food Sci Nutr. 37: 691-692
2. **Hus, S**. (2005). Green tea and the skin. J. Am. Acad. Dermatol., 52:1049-1059
3. **Sinija**, V.R., Mishra, H.N., (2008). Green tea Health benefits, Journal of Nutritional and Environmental Medicine. 17 (4): 232-242
4. **Friedman**, M., Mackey, B.E., Kim, H.J., Lee, I.S. and Lee K.R. (2007). Structure activity relationships of tea compounds against human cancer cells. J. Agric. Food Chem., 55:243-253
5. **Chen**, H.Y., Lin, Y.C. and Hsieh, C. (2007). Evaluation antioxidant activity of aqeous extract of some selected neutraceutical herbs. Food Chem., 104:1418-1424
6. **Reto**, M., Figueira, H.M. Filipe and Almeida, C.M. (2008). alcohol extract of *Camellia sinensis* Quimica nova Brazil, 31:317-320

7. **Sato**, T. and Miyata, G. (2000). The nutraceutical benefit, part I: green tea. Nutr. Pharmaceutic. 16: 315-317.
8. **Wu**, C.D., and Xian, W. (2002). Teas as a functional food oral health. Nutrition Oral Health 18:443-444.
9. **Yam**, T.S. and Shah, S. (1997). Hamilton-Miller JMT. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea *(Camellia sinensis)*, and of tea components. FEMS Microb Lett 152: 169-174;
10. **Hollman** A.S. (2000). flavones and flavanols nature, occurence and dietary burden. J Sci Food Agric 80: 1081-1093.
11. **MacFaddin**, F. J. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Printed in united state of America Publisher.
12. **NCCLS**. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. Twelfth Informational Supplement.
13. **Sibanda**,T. and Okoh, A.I. (2007). The challenges of overcoming antibiotic resistance : Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. Afr. J. Biotechnol. 6(25):2886-2896 .
14. **Eloff**, J.N. (1998). Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants. J. Ethnopharmacol. 60:1-8
15. **Gramza**, A., and Korczak, J. (2005) Tea constituents (*Camellia sinensis*) as antioxidants in lipid systems. Trends Food Sci Tech 16: 351-358.
16. **Sawi**, S.A. (2007). Comparison between the chemical composition and radical scavenging activities of essential oils of leaves , flowers and fruits of *callistemon lanceolatus* DC grown in Egypt. Planta Med. 73:892 .
17. **Cowan**, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4)564-582 .
18. **Sharangi**, A.B. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis*) A review. Food res. Int., 42:529-535
19. **Gramza** A, Korczak J, Hęś M, Jędrusek-Golińska A. (2004). Tea extracts influence on catalytical properties of Fe^{2+} in lipids. Polish Journal of Environmental Studies 13:143-146
20. **Perez**, L., Pauli, M. and Bazequre. P. (1990). Antibiotic assay by the agar-well diffusion method. Journal of Actabiology. 15:113-115 .