

مطالعه اثر مهارى عصاره برگ سبز چای *Camellia sinensis* بر رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1558

مهرنوش کافی*^۱، ناصر قائمی^۲، نور امیر مظفری^۳، کوروش فلک‌رو^۴، کتابون داستان^۵

۱*۵- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان - ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران - ایران، صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۴۳۱۴

۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران - ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳

۴- مرکز تحقیقات چای کشور، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، لاهیجان - ایران، صندوق پستی: ۱۱۶۳-۳۴

mkafi27@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۱

چکیده

برگ سبز چای *Camellia sinensis* حاوی ترکیبات پلی فنلی با اثرات ضد میکروبی است. از آنجا که چای از نوشیدنی‌های بسیار پر طرفدار در ایران و جهان می‌باشد، مطالعه اثر ضد میکروبی و مهارى آن بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا اهمیت زیادی خواهد داشت. در این پژوهش اثر مهارى و ممانعت‌کنندگی عصاره کلون‌های مختلف برگ سبز چای ۱۰۰، ۱۰۱، ۱۰۲، آسام، DN و KEN بر باکتری PTCC 1558 *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. ابتدا برگ‌های شش کلون مختلف چای جمع‌آوری و عصاره برگ سبز آن‌ها به روش پرکولاسیون تهیه و خشک شد. سپس باکتری در معرض شش غلظت مختلف عصاره چای به روش آزمون حساسیت باکتریایی (آنتی بیوگرام) با دیسک قرار داده شد. آزمون سه بار در روزهای مختلف انجام و میانگین قطر هاله‌های کلونی محاسبه شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که عصاره برگ سبز کلون‌های مختلف چای دارای اثر ضد باکتریایی هستند. همچنین مشاهده شد که رقت ۶/۲۵ عصاره‌های برگ سبز چای بهترین اثر مهارى را بر رشد باکتری داشتند. بر اساس تحقیقات به عمل آمده، به نظر می‌رسد پلی فنل‌های چای در شرایط خاص با تولید پراکسید هیدروژن به صورت پرواکسیدان عمل کرده‌اند و از این طریق اثر مهارى خود را بر رشد باکتری اعمال می‌کنند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که مصرف چای سبز می‌تواند به عنوان درمان کمکی در بیماران تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح باشد.

کلمات کلیدی: چای، *Camellia sinensis*، PTCC 1558 *Pseudomonas aeruginosa*، روش آنتی‌بیوگرام و اثر مهارى.

مقدمه

سودوموناس باکتری متحرک هوازی، گرم منفی متعلق به خانواده سودوموناسه‌ها بوده و طبقه بندی آن بر اساس هومولوژی rRNA / DNA و مشخصات کشت مشترک آن‌ها می‌باشد (۱۵). سودوموناس آئروژینوزا با وجود هوازی بودن در حضور نیترات در شرایط بی هوازی می‌تواند رشد کند (۱۴). سودوموناس دو نوع پیگمان سبز و آبی تولید می‌کند که پیگمان آبی یا پیوسیانین یک صفت مشخص در آلودگی‌های چرکی می‌باشد (۱۵). سودوموناس آئروژینوزا در همه جا مانند خاک، آب، سبزیجات زیست می‌نماید اما بیشتر در محیط مرطوب دیده می‌شود (۱۴). معمولاً به تنهایی برای انسان قدرت بیماری‌زایی ندارد بلکه اغلب اوقات به کمک باکتری دیگری در ایجاد عفونت ثانوی دخالت می‌کند (۸ و ۱۷). سودوموناس آئروژینوزا در کسانی که سیستم دفاعی بدن آن‌ها دستخوش اختلال گردیده است به عبارتی دارای ضعف سیستم ایمنی می‌باشند، می‌تواند عفونت شدید ایجاد نماید. از جمله این موارد شامل سوختگی‌ها و یا افرادی است که تحت درمان با داروهای ایمنوساپرسیو و یا ضد میکروبی هستند (۱۶و۴). این باکتری به علت مقاومت ذاتی و بروز تغییرات ژنتیکی، به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشد و مشکلات درمانی بسیاری را ایجاد می‌کند. بنابراین برای درمان نباید از یک آنتی‌بیوتیک استفاده نمود زیرا باکتری به سرعت به آن مقاوم می‌شود (۱۴)، ۱۵ و ۱۶). به منظور جلوگیری از این مشکلات، بررسی ویژگی ضد میکروبی عصاره چای لازم و با ارزش است چه بسا بتوان از آن‌ها به عنوان داروهای کمکی استفاده کرد و از عوارض مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها پیش‌گیری به عمل آورد. اثر بخشی برخی از عصاره‌های کلون‌های

چای در این زمینه قبلاً مورد بررسی قرار گرفته است (۶ و ۱۰).

چای یکی از محصولات اساسی وابسته به صنایع عمده کشاورزی است که به دلیل ارزش‌های کمی و کیفی آن در امر تغذیه و تأثیر تخدیری، امروزه به عنوان یک آشامیدنی آرام‌بخش و رایج از ضروریات زندگی خانواده‌ها محسوب می‌گردد و کشت و کار، تولید و توزیع، صادرات و واردات و مصرف آن در اقتصاد کشورهای جهان مقام مهمی را به خود اختصاص داده است. کشت چای در ایران از سال ۱۳۱۹ هجری توسط کاشف‌السلطنه در شهر لاهیجان عملی شد. و بدین ترتیب امروزه ایران یکی از کشورهای تولید کننده چای محسوب می‌گردد چای از یک غنچه و دو برگ کاملیا سیننسیس از خانواده تناسه، پس از عملیات چای‌سازی شامل پلاس، مالش، اکسیداسیون و خشک کردن به دست می‌آید (۱۱). اگر آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز برگ‌های چای پس از برداشت غیر فعال شود، اکسیداسیون کاتچین‌های چای صورت نمی‌گیرد و مواد موثر آن‌ها پایدار باقی می‌ماند و در نهایت چای سبز تولید می‌گردد. ولی اگر به آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز اجازه فعالیت بیشتری داده شود، درجه حرارت اکسیداسیون نیز افزایش می‌یابد و در نهایت چای سیاه حاصل می‌شود. مجموع پلی‌فنل‌های اکسید شده چای را تانن می‌نامند که به طور کل با سایر تانن‌های گیاهی متفاوت است (۳). چای سبز غنی از مواد آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و ضد سرطان است (۷). در هر فنجان چای سبز بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از پلی‌فنل‌ها و ۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم کافئین با تأثیر آرام بخشی وجود دارد. از مواد دیگر موجود در چای سبز، فلاونول‌ها و ترکیبات معطر است. در صورتی که برگ‌های سبز چای به صورت

واکنش متقابل بین ارقام مختلف چای بررسی شد. بدین ترتیب ارائه راه کارهای جدید جهت درمان و ترویج استفاده از چای سبز به جای داروهای شیمیایی می تواند از اهداف کاربردی این تحقیق به شمار آید.

مواد و روش ها

برگ سبز کلون های مختلف چای ۱۰۰، ۱۰۱، ۱۰۲، آسام، DN و KEN در مرداد ماه از ایستگاه های تابعه مرکز تحقیقات چای کشور تهیه گردید. بلافاصله با حرارت، آنزیم های پلی فنل اکسیداز آن غیر فعال شد. طبق روش پرکولاسیون، ۱۰ گرم از چای به همراه ۲۰۰ میلی لیتر اتانل ۷۰ درصد به ارلن مایر منتقل گردید. محلول حاصل پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه سلیسیوس از کاغذ صافی واتمن شماره دو عبور داده شد. سپس به تفاله فشرده شده ۲۰۰ میلی لیتر اتانل ۷۰ درصد اضافه شد و مراحل قبل تکرار گردید. با دستگاه تبخیر کننده، عصاره تغلیظ شد و حجم آن به ۲ میلی لیتر رسانده شد. عصاره تغلیظ شده با انکوباسیون در ۵۰ درجه سلیسیوس کاملاً خشک و سپس با کاردک تراشیده و در هاون سائیده شد. سپس از عصاره خشک شده، محلول ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر دی میتیل سولفوکسید (DMSO) تهیه و از آن غلظت های ۱/۵، ۳، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر محیط سرم فیزیولوژی استریل آماده شد.

کشت باکتری: در این مطالعه تجربی از سویه خالص باکتری *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1558 که از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه شد، استفاده گردید. محیط های کشت مولر هینتون برات (Mueller Hinton Broth) از شرکت مرک (Merck) تهیه شدند. در

مستقیم حرارت داده شوند کاتچین ها، از قبیل اپی کاتچین، اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین گالات و اپی گالوکاتچین گالات تجزیه می شوند. در فرهنگ آسیایی که چای سبز زیاد استفاده می شود، چای با حرارت غیر مستقیم بخار آب دم می کشد تا اپی گالوکاتچین آن حفظ شود. کاتچین یک آنتی اکسیدان بسیار قوی می باشد و از رشد سلول های سرطانی ممانعت می کند (۷). Toda و همکاران (۱۸) ثابت کردند که عصاره های چای باعث کشتن یا ممانعت از رشد باکتری های بیماری زایی مانند *epidermidis*، *Staphylococcus aureus* و *Shigella dysenteriae*، *Staphylococcus* و *Vibrio cholerae* می گردد، هم چنین آن ها گزارش نمودند که غلظت هایی از چای موجود در یک فنجان چای (۳ میلی گرم در میلی لیتر) قادر به از بین بردن *Staphylococcus aureus* مقاوم به متی سیلین می گردد (۱۸). دانشمندان دیگر هم نشان دادند که پلی فنل های برگ سبز چای اثر مهاری بر رشد *Streptococci*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* دارند (۵). در روزگاران قدیم چای به عنوان دارو برای معالجه بیماری های کلیوی، تب و عفونت های مجاری تنفسی توصیه می شد. چای دارای پلی فنل های آرام بخش و مفرحی مانند تئائوفلایین و تئاروبیجین است. چای دم کرده علاوه بر کافئین و پلی فنل های اکسید شده، مقادیر کمی مواد پروتئینی و هیدرات های کربن نیز دارد که در هیچ مواد غذایی تفننی یک فرد به این اندازه وجود ندارد (۱۳). هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر مهاری چای در مقابل سودوموناس آئروژینوزا می باشد. این اثر هم به طور مستقل و هم در

ضد میکروبی چای بر رشد سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی از طریق تجزیه واریانس داده‌های حاصل و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن به کمک نرم‌افزار SPSS ارزیابی شد.

نتایج

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش (جدول ۱) نشان داد که مقادیر رقت در تأثیر برای تشکیل هاله عدم رشد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارد اما نوع رقم چای در بروز این هاله تأثیر گذار نبوده و نیز اثر متقابل بین ارقام چای و مقادیر رقت بی‌معنی بوده است. به عبارت دیگر روند تأثیر مقدار رقت مستقل از نوع رقم چای می‌باشد. اما با توجه به (نمودار ۱) مقایسه میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در رقت‌های مختلف عصاره چای سبز به روش دانکن نشان داد رقت ۶/۲۵ بهترین اثر مهاري را بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا داشت. هم‌چنین تغییرات قطر هاله عدم رشد باکتری در رقت‌های مختلف عصاره شش کلون چای نشان داد که در رقت ۱/۵، برگ سبز کلون DN، در رقت ۳، برگ سبز کلون ۱۰۰، در رقت ۶/۲۵، برگ سبز کلون ۱۰۰، در رقت ۱۲/۵، برگ سبز کلون آسام، در رقت ۲۵، برگ سبز کلون ۱۰۰، در رقت ۵۰، برگ سبز کلون آسام و در رقت ۱۰۰، برگ سبز کلون ۱۰۱ بهترین اثر مهاري را بر رشد سودوموناس آئروژینوزا را داشتند. شکل ۱، قطر هاله عدم رشد باکتری سودوموناس را در رقت ۶/۲۵ نشان می‌دهد.

آزمون حساسیت باکتریایی در برابر غلظت‌های عصاره چای، از روش دیسک استفاده شد (۲۰).

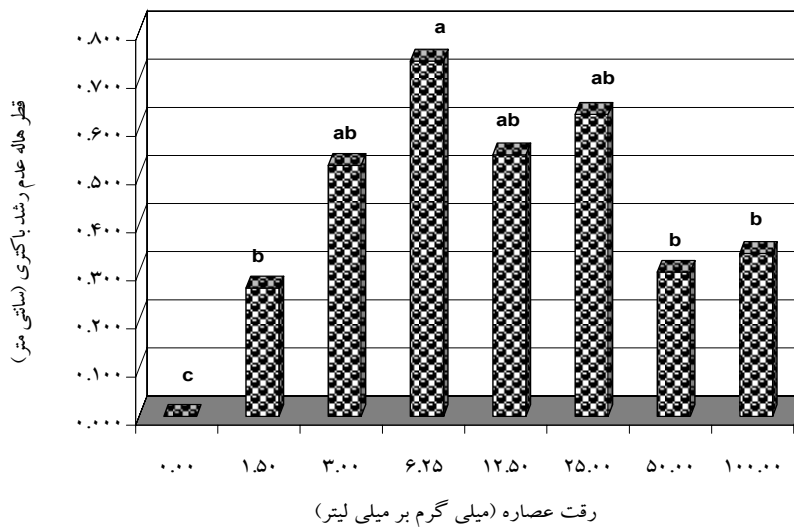
روش دیسک (disk diffusion test):
دیسک‌های شاهد (شرکت پادتن طب ایران) با مقدار ۲۵ میکرولیتر از غلظت‌های ۱/۵، ۳، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره به کمک سمپلر تلقیح شدند. دیسک‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شدند تا خشک شوند. از طرفی باکتری را در محیط مولر هیتتون آگار با کمک فیلدوپلاتین کشت خطی داده و پلیت‌ها را در ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرارداداده شدند تا به این ترتیب کلونی‌های مشخص در سطح محیط ظاهر شود. کلونی‌ها داخل محیط مولر هیتتون برات تلقیح گردیدند تا کدورتی متناسب با لوله ۰/۵ مک‌فارلند (McFarland) معادل 10^8 CFU/ml تهیه شود. سپس سوسپانسیون میکروبی، به پلیت‌های استریل ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت مولر هیتتون آگار تحت شرایط استریل، کشت خطی داده شدند. دیسک‌های خشک شده حاوی عصاره چای در شرایط استریل با پنس به روی محیط اضافه شدند (۹). پلیت‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سلیسیوس قرار گرفتند و پس از کامل شدن زمان انکوباسیون، پلیت‌های مربوط به دیسک‌های حاوی عصاره از انکوباتور خارج گردیدند. آزمون سه بار در روزهای مختلف انجام و میانگین قطر هاله‌های کلونی با کمک خط‌کش قرائت شد. فعالیت

جدول ۱: تجزیه واریانس ارقام چای و رقت عصاره در تأثیر بر عدم رشد باکتری سودوموناس

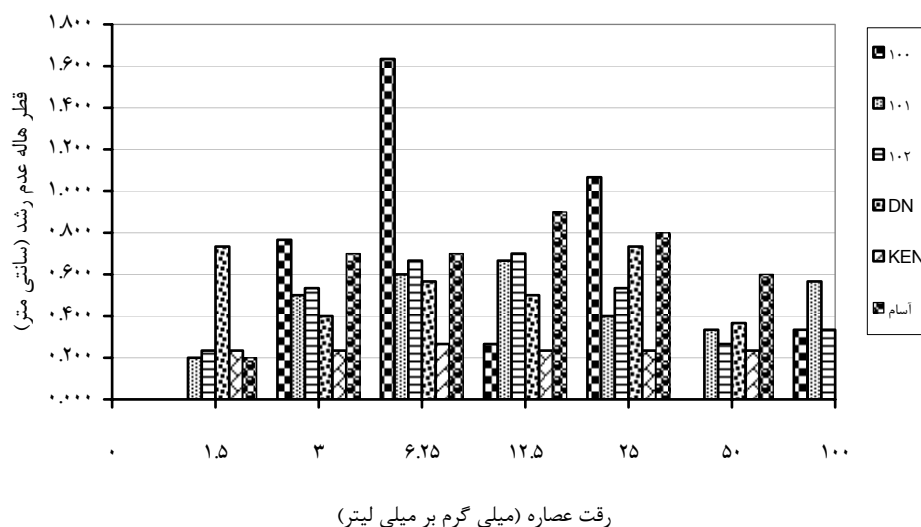
F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
۱/۳۴۲ ^{NS}	۰/۰۰۰۱۰۲	۰/۰۰۰۵۱۰	۵	ارقام چای
۴/۹۳۱ ^{**}	۰/۰۰۰۳۷۵	۰/۰۰۲۶۲۴	۷	رقت عصاره
۰/۷۳۵ ^{NS}	۰/۰۰۰۰۵۶	۰/۰۰۱۹۵۶	۳۵	ارقام × رقت
	۰/۰۰۰۰۷۶	۰/۰۰۷۲۹۷	۹۶	خطای آزمایش
	-	۰/۰۲۲۸۴۲	۱۴۳	کل



شکل ۱: هاله عدم رشد باکتری سودوموناس



نمودار ۱: مقایسه میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در رقت‌های مختلف عصاره چای سبز
حروف مشابه در دو رقت مختلف نشانه عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده است



نمودار ۲: تغییرات قطر هاله عدم رشد باکتری در رقت‌های مختلف عصاره شش کلون چای

بحث

اثرات مهاری برگ سبز چای، این احتمال را مطرح می‌کند که متابولیت‌های حاصل از فرایندهای اکسیداسیون در ضمن تخمیر برگ چای هم اثرات مهاری و هم توان آنتی‌اکسیدانی آن را کم می‌کند. ظاهراً خواص ضد میکروبی چای سبز مدیون اپی‌کاتچین‌گالات (ECG) و اپی‌گالوکاتچین‌گالات (EGCG) است. محققان این اثرات ضد باکتریایی را به تأثیرات هم‌افزاینده پلی‌فنل‌های منومریک چای نسبت داده‌اند (۷). پژوهشگران بیان نمودند که کاتچین‌های باکتریوسید به دولایه چربی غشا نیز آسیب می‌رسانند. اگرچه، پلی‌فنل‌ها، آنتی‌اکسیدان‌هایی قوی هستند، اما در شرایط ویژه ممکن است به عنوان پرواکسیدان عمل کنند. احتمال داده می‌شود که پلی‌فنل‌های چای از همین طریق، اثر مهاری خود را بر رشد باکتریایی اعمال می‌کنند. درباره اثرات ضد میکروبی انواع چای و پلی‌فنل‌های خالص آن در برابر انواع میکروب‌ها گزارش‌های متعددی منتشر شده است (۳). اثرات سینرژیستی چای با آنتی‌بیوتیک‌ها نیز

گزارش شده است (۱۷). Nataro (۱۳) بیان نمود که کاتچین، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین‌گالات و اپی‌گالوکاتچین موجود در برگ سبز چای مانع آزاد شدن وروتوکسین از *Escherichia coli* می‌شود. Lee و همکاران (۱۲) هم ثابت نمودند که باکترئوئیدزها در مقابل متابولیت‌های پلی‌فنلی حاصل از چای راحت از بین می‌روند. طبق یافته‌های به دست آمده در این مطالعه در آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک با افزایش مقدار عصاره اثر مهاری به درجاتی تخفیف یافت. از جمله علل احتمالی این تأثیر را می‌توان بر هم‌کنش اجزای عصاره چای در غلظتی خاص یا ناکافی بودن مقدار مواد ضد میکروبی چای دانست. پژوهشگران بیان نمودند که پلی‌فنل‌های گیاهی یا اصطلاحاً تانن‌ها از طریق اتواکسیداسیون و تولید پراکسیدهای پروژن، اثرات مهاری خود را بر رشد یاخته‌های میکروبی اعمال می‌کنند، ولی در شرایط محیطی خاصی امکان دارد ژن‌های خاصی در باکتری القاء شوند که نهایتاً با افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در

غلظت ۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره چای، روزانه مصرف حدود ۳ فنجان چای برای بیماران توصیه می گردد.

از آنجایی که طب سنتی ایران عمدتاً بر پایه استفاده از گیاهان دارویی استوار است و با پیشینه چند صد ساله ظرفیت های بالایی در زمینه پیشگیری و درمان بیماری ها دارد بدین ترتیب نتایج این مطالعه با توجه به اثرات بیوشیمیایی مواد و همچنین در دسترس بودن این گیاه با حجم زیاد و با جایگزینی اجزای مؤثر طبیعی به جای مواد شیمیایی در تهیه داروهای گیاهی می تواند حائز اهمیت باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای دکتر مهدی آسمار مدیر محترم گروه کارشناسی ارشد و جناب آقای دکتر محمد فائزی مدیر محترم گروه کارشناسی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و بخش تحقیقاتی نهال و بذر مرکز تحقیقات چای لاهیجان کمال سپاس و تشکر را دارم.

منابع

1. Ahn, Y.J.; Kawamura, T.; Kim, M.; Yamamoto, T. and Mitsuoka, T. 1991. Tea polyphenols: selective growth inhibitors of *Clostridium spp.* Agriculture Biological Chemistry Journal, pp.1425-1426.
2. An, B.; Kwak, J.H.; Son, J.H.; Park, J.M.; Lee, J.Y.; Jo, C. and Byun, M.W., 2004. Biological and antimicrobial activity of irradiated green tea polyphenols. Food Chemistry Journal. Vol. 88(4), pp.549-555.
3. Bandyopadhyay, D.; Chatterjee, T.K.; Dasgupta, A.; Lourduraja, J.; Dastidar, S.G., 2005. *In vitro* and *In vivo* antimicrobial action of tea: The commonest beverage of Asia. Biol Pharm Bull, pp.2125-2127.

باکتری موجبات غلبه آن را بر اثرات مهاری تاننها فراهم می آورند (۱۶).

این نتایج می تواند این واقعیت را نشان دهد که با توجه به ساختار فیزیولوژیک و پوشش خارجی سودوموناس که مانند سدی علیه نفوذپذیری مواد عمل می کند و از طرف دیگر دارای آنزیم هایی در فضای پری پلاسمیک می باشند که قادرند مولکول های خارجی را تجزیه کنند اما عصاره چای در رقت های متفاوت توانست باعث عدم رشد باکتری شود. Klibanov و همکاران (۱۰)، یافتند که عصاره های چای بر *Clostridium* و *Pseudomonas* باکتری های بیماری زای گیاهی مانند اروینیا مؤثر می باشد. بنابراین با توجه به اثرات بیوشیمیایی عصاره چای و با وجود مصرف زیاد و روزمره، می توان چای را برای مقاصد پزشکی مورد استفاده قرار داد. در این پژوهش اثر مهاری برگ سبز چای بارز بود. Tiwari و همکاران (۱۷)، اثرات ضد میکروبی چای سبز را بارز گزارش نمودند و این امر را مدیون اپی کاتچین و اپی گالوکاتچین گالات دانستند. Hamilton (۷)، چای سبز را غنی از مواد آنتی اکسیدانت و ضدسرطان دانست. در پژوهش حاضر کاربرد چای به صورت کلون های مختلف چای در غلظت ها متفاوت توانست باعث توقف رشد باکتری سودوموناس گردد اما با توجه به (نمودارهای ۱ و ۲) رقت ۶/۲۵ بهترین رقتی بود که هاله عدم رشد معنی داری را داشت. در این پژوهش از هر ۱۰ گرم چای خشک حدود ۱ گرم عصاره خشک به دست آمد و از آنجایی که هر فنجان چای با حجم ۱۰۰ میلی لیتر، حدود ۲/۵ گرم چای دارد و مقدار عصاره چای در هر فنجان برابر ۰/۲۵ گرم و غلظت آن معادل ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر است. بدین ترتیب برای تأمین

4. Chosa, H., 1991. Antimicrobial and microbial activities of tea and catechines against *mycoplasma*. KANSENSHOGAKU-ZASSHI, Vol. 66(5), pp.606-611.
5. Garbriella, E., 1994. Evaluation of three commercially available blood culture systems for cultivation of *H. Pylori* and *J. clin.*, MICROBIOL, pp. 1597-1598.
6. Hamilton, J.M.T., 1996. Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis*). Antimicrobial agents and chemotherapy Journal, pp.2375-2377.
7. Hamilton, J.M.T., 2001. Anticarcinogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). Journal of Medical Microbiology, pp.299-302.
8. Hancock, R.E.W. and Mutharia, L.M., 1993. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum- sensitive, non tenable strains deficient in IPO polysaccharide O side chain. Infect immune, Vol. 42, pp. 170.
9. Health Protection Agency., 2006. Susceptibility testing. National Standard Method: BSOP 45: (Issue 2): 312.
10. Klibanov, O.M.; Raasch, R.H. and Rublein, J.C., 2004. Single versus combined antibiotic therapy for gram negative infections. Ann Pharmacotherapy, pp.332-337.
11. Koo, M.W.L. and Cho, C.H., 2004. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. European Journal of Pharmacology, pp. 177-185.
12. Lee, H.C.; Jenner, A.M.; Low, C.S. and Lee, Y.K., 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal micro biotic. Research in Microbiology Journal , pp. 876-884.
13. Nataro, J.P., 2006. Atypical enter pathogenic *Escherichia coli*: typical pathogens Energy Infect Dis, pp. 6960.
14. Robert, J.; Rubin, A.; Harrington, C.A.; Poon, A. and Dietrich, K., 1999. The Economic Impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City Hospitals. Emerging Infections Diseases, Vol. 5(1), pp.207-211.
15. Sasaki, H.; Matsumoto, M.; Tanaka, T.; Maeda, M.; Nakai, M.; Hamada, S. and Ooshima, T., 2004. Antibacterial activity of polyphenol components in oolong tea extracts against mutants *Streptococci*. Caries Res, Vol.38, pp.2-8.
16. Smith, A.H.; Imlay, J.A. and Mackie, R.I., 2003. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. Appl. Environ Microbial, pp.110.
17. Tiwari, R.P.; Bhartisk, D.K.; Kaur, H.D.; Dikshit, R.P. and Hoondal, G.S., 2005. Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics. Indian J. Med Res, Vol. 122, pp.80-84.
18. Toda, M.; Okubo, S.; Hiyoshi R. and Shimamura, T., 1989. The bactericidal activity of tea and coffee. Letters in Applied Microbiology, pp.123-125.
19. Wheeler, SR., 1976. Tea and Tannins. Science, Vol. 204, pp.6-8.
20. Woods, D.E. and Ilewski, B.H., 1993. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspective. Rev Infect Dis, pp.715.