ORIGINAL ARTICLE

Effect of Essential Oils of Zingiber officinale, Cinnamomum verum, Trachyspermum ammi, Cuminum cyminum, and Carum carvi on Bacteria Inducing Clonal Dysbiosis In Vitro

Vahideh Tarhriz[1],
Ahmad Yari Khosroushahi[2],
Leila Ebrahimi Ghasor[3],
Babak Elyasifar[4],
Azita Dilmaghani[5]

[1]Assitant Professor, Molecular Medicine Research Center, Biomedicine Institute, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] Associate Professor, Department of Medical Nanotechnology, School of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3] Doctor of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
[4] PhD in Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[5] Associate Professor, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received November 24, 2020 Accepted August 30, 2021)

Abstract

Background and purpose: Misuse of antibiotics diminishes microbial balance of the body which has led to emergence of new diseases. In this research, we studied the effect of essential oils of *Zingiber officinale, Cinnamomum verum*, *Trachyspermum ammi*, and Carum carvi on intestinal microorganisms' effect in dysbiosis in vitro.

Materials and methods: Essential oils were prepared by indirect steam distillation. Pure and lyophilized microorganisms were purchased from Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST). After the culture media was preapered the wells were created over the agar plates and antimicrobial activity was defined by measuring the inhibition zone diameter after 24 hours. Antibacterial effects of the essential oils were studied by well assay methods, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Results were interpreted using CLSI standards.

Results: *Cinnamomum verum* had the highest inhibitory effect on all pathogens. *Trachyspermum ammi* essential oils had moderate inhibitory effect on all pathogens except *shigella Flexneri*. The essential oils of *Cuminum cyminum* and Carum carvi had similar inhibitory effects. Ginger essential oil showed no inhibitory effect on any of the pathogens.

Conclusion: The highest inhibitory effect on pathogens was seen in *Trachyspermum ammi* essential oil, while it had the least inhibitory effect on beneficial microorganisms. *Cinnamomum verum* essence, with very good inhibitory effect on pathogens and inhibition of some useful microorganisms, can be promising to make effective drug by modulating the activity of pathogens effective in dysbiosis of the clone.

Keywords: medicinal plants, dissubiosis clone, minimum inhibitory concentration, minimum concentration of fatalities, antibiotic

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (201): 16-27 (Persian).

* **Corresponding Author: Azita Dilmaghani -** Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (E-mail: dilmaghania@tbzmed.ac.ir)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 201 مهر سال 1400 (27-16)

تاثیر اسانس های گیاه زنجبیل، دارچین، زنیان و زیره بر برخی از باکتری های ایجاد کننده دیس بیوزیس روده در شرایط آزمایشگاهی

وحیده طرح ریز[1]
احمد یاری خسروشاهی[2]
لیلا ابراهیمی قصور[3]
بابک الیاسی فر[4]
آزیتا دیلمقانی[5]

چکیده

سابقه و هدف: امروزه مصرف نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها با بهم زدن تعادل میکروبی بدن، زمینه ساز بروز بیماری‌های جدید شده اند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاهان زنجبیل، دارچین، زنیان، زیره سبز و زیره سیاه بر روی برخی باکتری‌های ایجادکننده دیس‌بیوزیس جهت تعدیل فلور میکروبی روده در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: اسانس گیاهان دارویی از طریق تقطیر به روش بخار غیرمستقیم تهیه و میکروب‌ها از مرکز کلکسیون (IROST) خریداری شدند. بعد از آماده شدن محیط کشت‌ها، چاهک‌گذاری انجام شد و بعد از 24 ساعت هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی(MIC) و حداقل غلظت‌کشندگی مخمرها و باکتری‌های بیماریزا، به ترتیب از روش ماکرودیلوشن و میکرودیلوشن استفاده شد. نتایج حاصل، طبق استانداردهای CLSI تفسیر شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که اسانس دارچین بیش‌ترین اثر مهاری را بر روی همه باکتری‌های بیماریزا داشته است. اسانس زنیان نیز بجز شیگلا فلکسنری روی سایر باکتری‌های بیماریزا اثر مهاری متوسطی داشت. اسانس زیره سبز و زیره سیاه، مشابه عمل کرده و اسانس زنجبیل هیچ اثری روی هیچ‌کدام از باکتری‌های بیماریزا نشان نداد.

استنتاج: با توجه به نتایج به‌دست آمده اسانس زنیان با بیش‌ترین اثر مهاری روی باکتری‌های بیماریزا بسیار خوب عمل کرده است. اسانس دارچین نیز اثرمهاری بسیار خوبی بروی باکتری‌های بیماریزا و عدم بازدارندگی روی برخی باکتری‌های مفید نشان داد، لذا این گیاهان می‌توانند با تعدیل فعالیت باکتری‌های بیماریزای موثر در دیس‌بیوزیس، برای ساخت داروی موثر، امیدوارکننده باشند.

واژه های کلیدی: گیاهان دارویی، دیس بیوزیس روده، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی، حداقل غلظت کشندگی، آنتی بیوتیک

مقدمه

امروزه به علت بروز مقاومت‌های میکروبی، استفاده از گیاهان و ترکیبات آن‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های رایج مطرح است. نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که اسانس برخی از گیاهان توانایی مهار رشد

مولف مسئول: آزیتا دیلمقانی - تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی E-mail: dilmaghania@tbzmed.ac.ir

1. استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
2. دانشیار، گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
3. داروسازی عمومی، گروه بیوتکنولوژی داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پرشکی تبریز، تبریز، ایران
4. دکترای بیوتکنولوژی داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پرشکی تبریز، تبریز، ایران
5. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پرشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت : 1399/9/4 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1399/9/10 تاریخ تصویب : 1400/6/8

میکروارگانیسم‌ها را دارا هستند و به این لحاظ، گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید کاربردهای زیادی از جمله در پزشکی، صنایع غذایی و غیره پیدا نموده‌اند(1). محصولات طبیعی منشاء بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار می‌باشند. تعداد اندک و نگران‌کننده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های در حال توسعه در صنعت داروسازی وجود دارند. با این حال، محصولات طبیعی همچنان منبع امیدوارکننده و جدیدی برای آنتی بیوتیک‌ها هستند، هر چند برای بهبود کارایی، کشف رویکردهای جدید ضروری به نظر می‌رسد(2). امروزه تحقیق و توسعه در زمینه داروهای جدید حاصل از منابع طبیعی به عنوان یک راه نظام‌مند، راهبردی و اقتصادی در سطح جهان اهمیت خاصی پیدا کرده است. به‌طوری که در حال حاضر درصد زیادی (بیش از 30 درصد) داروهای گیاهی برگرفته از منابع طبیعی در بیمارستان‌ها و درمانگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند(3). گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها امروزه 20 درصد تجویزات دارویی مربوط به کشورهای صنعتی پیشرفته و 80 درصد کشورهای در حال توسعه را به خود اختصاص داده‌اند. از آن‌جایی‌که گیاهان مفید دارویی در کشور ما فراوان می‌رویند، بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها می‌تواند گامی مثبت در شناسایی و استفاده بهینه از این ثروت ملی با ارزش باشد. استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها در سال‌های اخیر روند رو به رشدی پیدا کرده است(4). از طرفی دیگر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌ها منجر به ظهور ایزوله‌های مقاوم میکروبی شده است که هر روز بر تعداد آن‌ها افزوده می‌شود. ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی اهمیتی برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌نماید(2). گیاهان و ترکیبات آن‌ها شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با توانایی بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند(5). این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی کم‌تر است(1).

یکی از مناطق بدن که بسیار وابسته به تغییرات میکروبی است، روده می‌باشد. در حال حاضر محققان معتقد هستند که تغییرات میکروبی فلور روده و فعالیت‌های آن می‌تواند به بیماری‌های مزمن و دژنراتیو متعددی منجر شود(6). سندرم روده تحریک‌پذیر، بیماری التهابی روده، آرتریت روماتوئید، اسپوندیلیت آنکیلوزان و سرطان روده همه با تغییرات میکروبی فلور روده مرتبط هستند. فرضیه اختلال روده ای نشان می‌دهد که تعدادی از عوامل مرتبط با زندگی مدرن غربی تاثیر مخربی بر میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش دارند. عوامل متعددی مانند آنتی‌بیوتیک درمانی، استرس روانی و فیزیکی و بعضی از اجزای رژیم غذایی بر بروز دیس بیوزیس نقش بازی می‌کنند. در این بیماری باکتری‌های بیماری‌زایی (پاتوژن) همچون اشریشیاکلی، سالمونلا، کلبسیلا، شیگلا و غیره می‌توانند اثر داشته باشند(9-7).

دیس بیوزیس (Dysbiosis) یا به معنی به هم خوردن توازن باکتری‌های روده است. روده بزرگ میزبان هزاران میکروارگانیسم می‌باشد که بعضی از آن‌ها مفیدند و در واقع به حفظ سلول‌های روده کمک کرده و آن‌ها را از ابتلا به بیماری‌های مختلف محافظت می‌کنند. اما برخی دیگر بالقوه مضر هستند که می‌توانند آسیب رسانده و موجب مسمومیت روده شوند. روده سالم، روده‌ای است که بتواند میان این باکتری‌ها توازن ایجاد کند(9).

تاکنون مطالعات مربوط به تاثیر اسانس گیاهان زنجبیل (Zingiber officinale) از خانواده گیاهی زیجیبراسه (Zingiberaceae)، دارچین (Cinnamomum zeylanicum) از خانواده لاوراسه (lauraceae)، زنیان (Trachyspermum ammi) از خانواده اپیاسه (Apiaceae) و زیره (Carum carvi) از خانواده اپیاسه (Apiaceae) علیه باکتری‌های بیماری‌زا بوده است و این پژوهش تنها مطالعه‌ای است که در آن نقش اسانس‌های مذکور بر روی تنوع زیستی باکتری‌های مفید روده بررسی شده است، تا مشاهده شود که آیا این اسانس‌ها انتخابی عمل

می‌کنند یا خواص ضدمیکروبی آن‌ها غیر انتخابی است. گیاهان زنجبیل، دارچین، زنیان و زیره می‌توانند پتانسیل خوبی علیه باکتری‌های موثر در بیماری دیس‌بیوزیس داشته باشند. انتظار می‌رود اسانس این گیاهان با ایجاد تعادل در تنوع زیستی باکتری‌های مفید روده به برقراری سلامت روده و پیشگیری از بروز بیماری‌های متعاقب آن کمک کنند(4). بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است که اسانس‌های این چهار گیاه خصوصا دارچین و زنجبیل اثرات ضد میکروبی چشمگیری بر روی باکتری‌های بیماریزای روده داشته است(12-10). در این مطالعه سعی بر آن داریم تا اثر این اسانس‌ها بر روی تنوع زیستی باکتری‌های مفید روده و متعاقبا بر روی باکتری‌های مفید نیز بررسی شود تا مشاهده شودکه آیا این اسانس‌ها انتخابی عمل می‌کنند یا برعکس همه باکتری‌های مفید و مضر را با هم از بین می‌برند. بنابراین هدف از این تحقیق مطالعه اثر ضد باکتری انتخابی اسانس‌های مورد مطالعه در مورد باکتری‌های بیماریزا در مقایسه با باکتری‌های مفید به منظور احتمال کاربرد آن‌ها برای اصلاح تنوع زیستی باکتری‌های مفید روده انسان در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها

آماده سازی باکتری های بیماریزا

باکتری‌های بیماریزا به‌صورت خالص ولیوفیلیزه از مرکز نگهداری میکروب‌های صنعتی ایران خریداری و در 20میلی‌لیتر محیط کشت LB در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24ساعت گرمخانه (Incubated) قرار گرفتند (جدول شماره 1). ابتدا نمونه حاصل به محیط کشت جامد مربوطه منتقل و تحت شرایط فوق تکثیرشدند. سپس جهت تهیه محلول میکروبی در مجاورت شعله از کشت 24 ساعته میکروب‌های خالص در لوله‌های آب مقطر استریل قرار داده شد و کدورت حاصل از محلول میکروبی معادل استاندارد 0/5 مک فارلند ثبت شد.

جدول شماره 1:میکروب های خریداری شده از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران(IROST).

نام فارسی	نام انگلیسی	کد PTCC
کلبسیلا پنومونیه	*Klebsiella pneumoniae*	PTCC 1290
شیگلا فلکسنری	*Shigella Flexneri*	PTCC 1234
سودوموناس آئروژینوزا	*Pseudomonas aeruginosa*	PTCC 1811
لیستریا مونوسیتوژنز	*Listeria monocytogenes*	PTCC 1163
اشریشیا کلی	*Escherichia coli*	PTCC 1330
باسیلوس سرئوس	*Bacillus cereus*	PTCC 1015
لاکتوباسیلوس پاراکازئی	*Lactobacillus paracasei*	PTCC 0
لاکتوباسیلوس کازئی	*Lactobacillus casei*	PTCC 1608
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	*Lactobacillus plantarum*	PTCC 1058
ساکارومایسز سرویزیه	*Saccharomyces cerevisiae*	PTCC 5052
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	*Bifidibacterium bifidum*	PTCC 1644
پیکیا کودریاوزوی 22	*Pichia kudriavzevii 22*	PTCC 0
کلایورومایسس مارکسیانوس	*Kluyveromyces marxianus*	PTCC 5188
پیکیا کودریاوزوی	*Pichia kudriavzevii*	PTCC 0
کاندیدا کروزئی	*Candida krusei*	PTCC 5295
پیکیا فرمانتس	*Pichia fermentans*	PTCC 5296
پیکیا کودریاوزوی 21	*Pichia kudriavzevii 21*	PTCC 0

آماده سازی اسانس ها

ریشه گیاه زنجبیل، پوسته درخت دارچین، میوه گیاه زنیان و دانه زیره از بازار تبریز (بخش عطاری فروشان) خریداری شدند و سپس به مرکز تحقیقات باریج اسانس فرستاده شد. در آن‌جا به طریق بخار غیر مستقیم تقطیر اسانس این گیاهان تهیه و دوباره به دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز ارسال شد. قبل از انجام روش ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی یا minimum inhibitory concentration (MIC) و حداقل غلظت کشندگی یا Minimum Bacteriocidal Concenteration (MBC) رقیق‌سازی با 3 میلی‌لیتر از اسانس در 3/3 میلی‌لیتر اتانول و 4/7 میلی‌لیتر توئین 80 انجام شد.

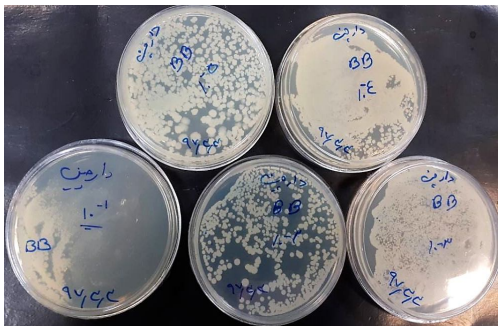
تعیین هاله عدم رشد باکتری‌های بیماریزا در برابر اسانس‌های گیاهی

در روش چاهک‌گذاری، ابتدا به وسیله انتهای پیپت پاستور چاهک‌هایی در محیط کشت تعبیه شد. سپس 100 میکرولیتر از اسانس، به طور جداگانه در چاهک‌ها ریخته شده و در هر ظرف کشت یک چاهک به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، باحفظ شرایط استاندارد در انجام تست‌های حساسیتی، از محلول میکروبی با استاندارد

0/5 مک فارلند هرسویه به طور جداگانه به روش کشت چمنی بر روی محیط،کشت داده شد. سپس پلیت‌های کشت شده در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شده و قطر هاله‌های عدم رشد مورد سنجش قرار گرفتند(13).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های گیاهی برروی باکتری‌های مفید به روش ماکرودایلوشن براث

برای تعیین داقل غلظت ممانعت‌کنندگی و انجام رقیق‌سازی متوالی اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه، 10 لوله شیشه‌ای در پیچ‌دار که هر یک حاوی 100 µl آب مقطر استریل بود را در جا لوله‌ای قرار داده و از شماره 1 تا 12 شماره‌گذاری شد و این مجموعه هم دوباره در اتوکلاو ضدعفونی شد (تصویر شماره1) (14).



تصویر شماره 1: نمونه ای از تست حداقل غلظت کشندگی مربوط به تست اسانس دارچین در برابر بیفیدوباکتریوم بیفیدوم

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های بیماریزا به روش میکرودایلوشن براث

ابتدا اسانس گیاهی رقیق‌سازی شد تا اسانس با غلظت 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آید. برای انجام این تست از میکروپلیت 96 خانه استفاده شد. در هر چاهک به‌طور برابر مقدار 160 میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. از باکتری بیماریزا 0/5 مک فارلند معادل 600 چگالی نوری (Optical density: OD) تهیه و به میزان 0/1 میکرولیتر رقیق شد و به‌طور برابر به همه چاهک‌ها 20 میکرولیتر اضافه شد. از اسانس گیاهی غلظت‌های متفاوت و طور سریالی از 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا 3/125 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و در نهایت میزان 20 میکرولیتر از هر غلظت به چاهک‌های مختلف اضافه و غلظت 0/1 میکرولیتر رقیق شد. به این ترتیب غلظت چاهک‌ها از 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا 3/125 میلی‌گرم بر میلی لیتر حاصل شد. چاهک کنترل مثبت حاوی 0/5 مک فارلند از باکتری بیماری‌زا و محیط کشت و چاهک کنترل منفی حاوی اسانس گیاهی و محیط کشت بود. پس از کشت، میکروپلیت‌ها شیک شدند تا مخلوط کاملا یکنواخت گردد. سپس میکروپلیت‌ها به مدت 24 ساعت در داخل انکوباتور در دمای 37°C قرار داده شدند و نتایج مورد مطالعه قرار گرفت. پس از طی این مدت کدورت چاهک‌ها و رشد باکتری‌ها در مقایسه با کنترل‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته و چاهک‌های با کم‌ترین غلظت اسانس که فاقد رشد باکتری بود و کدورتی در آن‌ها مشاهده نشده بود به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی در نظر گرفته شد. در مرحله بعد از محتوی چاهک حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و دو چاهک قبل از آن به مقدار 20 میکرولیتر روی محیط کشت مخصوص باکتری کشت داده شدند و به مدت 24 ساعت و در دمای 37°C در انکوباتور قرار داده شدند. بالاترین رقت موجود از اسانس که رشد باکتری مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت‌کشندگی این اسانس در نظر گرفته شد(14).

یافته ها

در بررسی‌های انجام شده در بین اسانس‌های مورد مطالعه دارچین بیش‌ترین اثر مهاری روی همه باکتری‌های بیماریزا نشان داد. قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شده مربوط به این اسانس بین 3/1 تا 4/1سانتی‌متر مشاهده شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این اسانس روی شیگلا فلکسنری 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سایر باکتری‌های بیماریزا 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. اسانس

زنجبیل اثر مهاری روی هیچیک از باکتری‌های بیماری‌زای مورد مطالعه نشان نداد. اسانس زنیان روی شیگلا فلکسنری اثر مهاری نشان نداد، اما روی سایر باکتری‌های بیماریزا اثر متوسط با قطر هاله عدم رشد از 0/8 تا 1/8 سانتی‌متر نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این اسانس، 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. اسانس زیره سبز روی باکتری‌های بیماریزای لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس اثر مهاری نشان نداد و قطر هاله عدم رشد در سایر باکتری‌های بیماری‌زا بین 1/2 تا 1/6 سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این اسانس روی کلبسیلا پنومونیا 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سایر باکتری‌های بیماری‌زا 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مورد اسانس زیره سیاه نیز همانند زیره سبز روی باکتری‌های بیماری‌زای لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس اثر مهاری نشان نداد و قطر هاله عدم رشد در سایر باکتری‌های بیماریزا بین 1/2 تا 1/5 سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این اسانس روی باکتری‌های بیماری‌زا 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جداول شماره 2، 3 و4).

در بررسی اثرات اسانس‌های مورد مطالعه روی باکتری‌های مفید روده، دارچین بیش‌ترین اثرات مهارکنندگی نشان داد. هرچند روی ساکارومایسز سرویزیه، پیکیا کودریاوزی و پیکیا کودریاوزی 22، کلایورومیسیز مارکسیانوس و کاندیدا کروزئی اثرات مهاری دیده نشد.

قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شده مربوط به این اسانس در سایر باکتری‌ها بین 3/2 تا 4/1سانتی‌متر مشاهده شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این اسانس روی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم 3/125 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پیکیا فرمانتنس 6/25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پیکیا کودریاوزی 21 میزان 12/5میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سایر باکتری‌های بیماریزا 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. اسانس زنجبیل اثر مهاری روی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم با قطر هاله عدم رشد 1/4و 1/3 سانتی متر و حداقل غلظت بازدارندگی 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. اسانس زنیان نیز روی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم با قطر هاله عدم رشد 1/1 و 1/0 سانتی‌متر و حداقل غلظت بازدارندگی 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد. اسانس زیره سبز روی ساکارومایسز سرویزیه، پیکیا کودریاوزی، کلایورومیسیز مارکسیانوس و کاندیدا کروزئی اثر مهاری نشان نداد. قطر هاله عدم رشد در سایر باکتری‌های بیماریزا بین 1/0 تا 2/3 سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این اسانس روی لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سایر باکتری های بیماریزا 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مورد اسانس زیره سیاه روی لاکتوباسیلوس پاراکازئی، ساکارومایسز سرویزیه، پیکیا کودریاوزی، کلایورومیسیز مارکسیانوس و کاندیدا کروزئی اثر مهاری نشان نداد. قطر هاله عدم رشد در سایر باکتری‌های بیماریزا بین 1/2 تا 2/9 سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این اسانس روی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای لاکتوباسیلوس پلانتاروم 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سایر باکتری‌های بیماریزا 25 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جداول شماره 5 ، 6 و7).

جدول شماره 2: قطر هاله عدم رشد اسانس های گیاهی بر روی باکتری های مضر روده بر حسب سانتی متر

	اسانس زنیان	اسانس زیره سبز	اسانس زیره سیاه	اسانس دارچین	اسانس زنجبیل
کلبسیلا پنومونیا	1,8	1,5	1,4	4	0
شیگلا فلکسنری	0	1,6	1,2	3,9	0
سودوموناس آئروجنوزا	0,9	1,2	1,5	3,5	0
لیستریا مونوسیتوژنز	0,9	0	0	3,1	0
اشریشیا کلی	1	0	0	3,8	0
باسیلوس سرئوس	0,8	0	0	4,1	0

جدول شماره 3: مقادیر حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس‌های گیاهی در باکتری های مضر روده بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

	اسانس زنیان	اسانس زیره سبز	اسانس زیره سیاه	اسانس دارچین	اسانس زنجبیل
کلبسیلا پنومونیا	50	25	50	25	NI
شیگلا فلکسنری	-	50	50	12,5	-
سودوموناس آئروجنوزا	50	50	50	25	-
لیستریا مونوسیتوژنز	50	-	-	25	-
اشریشیا کلی	50	-	-	25	-
باسیلوس سرئوس	50	-	-	25	-

جدول شماره 4: نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های گیاهی در باکتری های مضر روده بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

	اسانس زنیان	اسانس زیره سبز	اسانس زیره سیاه	اسانس دارچین	اسانس زنجبیل
کلبسیلا پنومونیا	50	25	50	25	-
شیگلا فلکسنری	-	50	50	12,5	-
سودوموناس آئروجنوزا	50	50	50	25	-
لیستریا مونوسیتوژنز	50	-	-	25	-
اشریشیا کلی	50	-	-	25	-
باسیلوس سرئوس	50	-	-	25	-

جدول شماره 5 : قطر هاله عدم رشد اسانس های گیاهی بر روی باکتری های مفید روده بر حسب سانتی متر

	اسانس زنیان	اسانس زیره سبز	اسانس زیره سیاه	اسانس دارچین	اسانس زنجبیل
لاکتوباسیلوس پاراکازئی	0	1	0	3,2	0
لاکتوباسیلوس کازئی	1,1	2,3	1,9	3,6	1,4
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	1	1,9	1,5	3,5	1,3
ساکارومایسز سرویزیه	0	0	0	0	0
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	0	1,9	2,9	4,1	0
پیکیا کودریاوزی 22	0	1,1	1,2	0	0
کلایورومیسز مارکسیانوس	0	0	0	0	0
پیکیا کودریاوزی	0	0	0	0	0
کاندیدا کروزئی	0	0	0	0	0
پیکیا فرمانتنس	0	1,7	1,5	3,7	0
پیکیا کودریاوزی 21	0	1,9	1,4	3,2	0

جدول شماره 6: مقادیر حداقل غلظت ممانعت کنندگی اسانس های گیاهی در باکتری های مفید روده بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

	اسانس زنیان	اسانس زیره سبز	اسانس زیره سیاه	اسانس دارچین	اسانس زنجبیل
لاکتوباسیلوس پاراکازئی	-	50	-	25	-
لاکتوباسیلوس کازئی	50	25	25	25	25
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	50	50	50	25	25
ساکارومایسز سرویزیه	-	-	-	-	-
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	-	25	12,5	3,125	-
پیکیا کودریاوزی 22	-	25	25	-	-
کلایورومیسز مارکسیانوس	-	-	-	-	-
پیکیا کودریاوزی	-	-	-	-	-
کاندیدا کروزئی	-	-	-	-	-
پیکیا فرمانتنس	-	25	25	6,25	-
پیکیا کودریاوزی 21	-	25	25	12,5	-

جدول شماره 7: نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس های گیاهی در باکتری های مفید روده بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

	اسانس زنیان	اسانس زیره سبز	اسانس زیره سیاه	اسانس دارچین	اسانس زنجبیل
لاکتوباسیلوس پاراکازئی	-	50	-	25	-
لاکتوباسیلوس کازئی	50	25	25	25	25
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	50	50	50	25	25
ساکارومایسز سرویزیه	-	-	-	-	-
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	3,125	25	12,5	3,125	-
پیکیا کودریاوزی 22	-	25	25	-	-
کلایورومیسز مارکسیانوس	-	-	-	-	-
پیکیا کودریاوزی	-	-	-	-	-
کاندیدا کروزئی	-	-	-	-	-
پیکیا فرمانتنس	6,25	25	25	6,25	-
پیکیا کودریاوزی 21	3,125	25	25	12,5	-

بحث

فلور روده از حدود 50 گونه و 500 جنس باکتریایی مانند گونه‌های لاکتوباسیل‌ها، بیفیدوباکترها و پیکیا به‌عنوان باکتری‌های مفید تشکیل شده که می‌توانند با تولید مواد مغذی (مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و ویتامین‌های گروه B و ویتامین K)، هضم و جذب مواد غذایی، مهار باکتری‌های بیماریزا و تقویت سیستم ایمنی به بدن کمک کنند(15). از باکتری‌های بیماریزای موثر در دیس بیوزیس، می‌توان به گونه‌های باکتریایی شیگلا، کلبسیلا، سودوموناس، لیستریا و ... اشاره کرد که در صورت فراهم شدن شرایطی مانند مصرف رژیم غذایی سرشار از پروتئین‌های حیوانی، مواد سولفوردار، قندهای ساده و مصرف ناصحیح آنتی‌بیوتیک یا کاهش عملکرد سیستم ایمنی، فلور روده را بهم ریخته و با غلبه باکتری‌های بیماریزا، بیماری‌هایی مانند کلیت، اسهال و یا اختلال در جذب مواد غذایی و داروها فراهم می‌شود(16). یکی از راه‌های تعدیل فلور روده، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی (مانند ریفاکسیمین) می‌باشد که می‌توانند باکتری‌های بیماریزا را مهار کرده و حداقل اثر ممکن را بر باکتری‌های مفید داشته باشند. باتوجه به انعطاف پذیری باکتری‌ها در طی زمان و همچنین سوء مصرف و استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها، پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از چالش‌های مطرح است، لذا کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید، موضوعی ضروری است. بسیاری از گیاهان دارویی خواص بالقوه آنتی‌بیوتیکی از خود نشان داده‌اند که می‌توانند به‌عنوان آنتی‌بیوتیک طبیعی یا درمان کمکی همراه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها عوارض کم‌تری داشته و تحمل بهتری ایجاد می‌کنند و به‌عنوان راه حلی برای تعدیل فلور روده مورد استفاده قرار گیرند(17).

در مطالعات بسیاری روی گیاهان مختلف اثرات ضدمیکروبی آن‌ها جهت تعدیل فلور میکروبی در شرایط مختلف مورد بررسی قرارگرفته است. Nazzaro وهمکارانش در مطالعه خود، نشان دادند که اسانس گیاهان با دارا بودن ترکیبات ترپنی، ترپنوئیدی و فنیل پروپن‌ها می‌توانند

اثرات ضد باکتریایی داشته باشند. همچنین اشاره شده که باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیش‌تری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت از خود بروز می‌دهند(18).

Oulkheir و همکارانش اعلام کردند که اسانس دارچین اثرات بارز مهاری روی تمامی میکروب‌ها دارند و قطر هاله عدم رشد از 26 تا 32 میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اسانس آویشن و میخک نیز اثرات نسبتا خوب مهاری با قطر هاله عدم رشد 16تا22 میلی‌متری نشان دادند. این در حالی بود که اثر مهاری خاصی بر روی باکتری‌های بیماریزا توسط اسانس گل شمعدانی مشاهده نشد(19).

سلیمانی و همکارانش، بیش‌ترین اثر مهارکنندگی اسانس دارچین را بر روی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس نشان دادند که قطر هاله عدم رشد 47 میلی‌متر مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، آن‌ها پیشنهاد کردند که اسانس‌های دارچین و باریجه می‌توانند به تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل ضدمیکروبی برای درمان عفونت‌های باکتریایی موثر باشد(20). Sebiomo در مطالعه‌ای اثرات عصاره آبی و اتانولی زنجبیل بر روی دو باکتری بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پیوجنز را بررسی و با اثرات آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و تتراسایکلین مقایسه تطبیقی انجام دادند. در این مطالعه اثرات مهاری خوبی روی هر دو باکتری گزارش شد و پیشنهاد گردید که عصاره زنجبیل به‌عنوان آنتی‌بیوتیک کمکی در پیشگیری و درمان عفونت‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد(21).

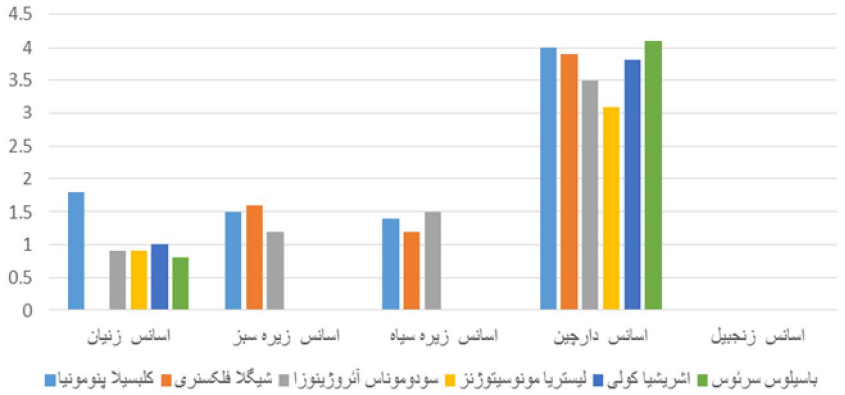
در این تحقیق سعی بر آن شده است تا اثرات ضد میکروبی اسانس‌های چهارگیاه مهم زنجبیل، دارچین، زنیان و زیره بر روی باکتری‌های بیماری‌زای دخیل در دیس بیوزیس در شرایط آزمایشگاهی بررسی شود. برای تعدیل دیس‌بیوزیس اسانسی موثر خواهد بود که روی باکتری‌های بیماریزا بیش‌ترین اثر مهاری را داشته و در عین حال روی باکتری‌های مفید اثرات بازدارندگی نداشته باشد. ترکیبات مهم این اسانس‌ها در جدول شماره 8 گردآوری شده است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه (نمودار شماره 1 و 2) مشخص شد که در بین اسانس‌های مورد مطالعه دارچین بیش ترین اثر مهاری برروی همه باکتری‌های بیماری‌زا دارد. البته لازم بذکر می‌باشد که در مورد باکتری‌های مفید نیز دارچین بیش‌ترین اثرات مهارکنندگی را نشان داد. هرچند روی ساکارومایسز سرویزیه، پیکیا کودریاوزی و پیکیا کودریاوزی 22، کلایورومیسیز مارکسیانوس و کاندیدا کروزئی اثرات مهاری دیده نشد. اما روی سایر باکتری‌ها بخصوص گونه‌های لاکتوباسیلوس اثرات مهاری قوی نشان داد. این اسانس روی لاکتوباسیلوس پاراکازئی اثر کشندگی (Bactericidal) نشان داد و در سایر موارد اثرات بازدارندگی(Bacteriostatic) مشاهده شد.

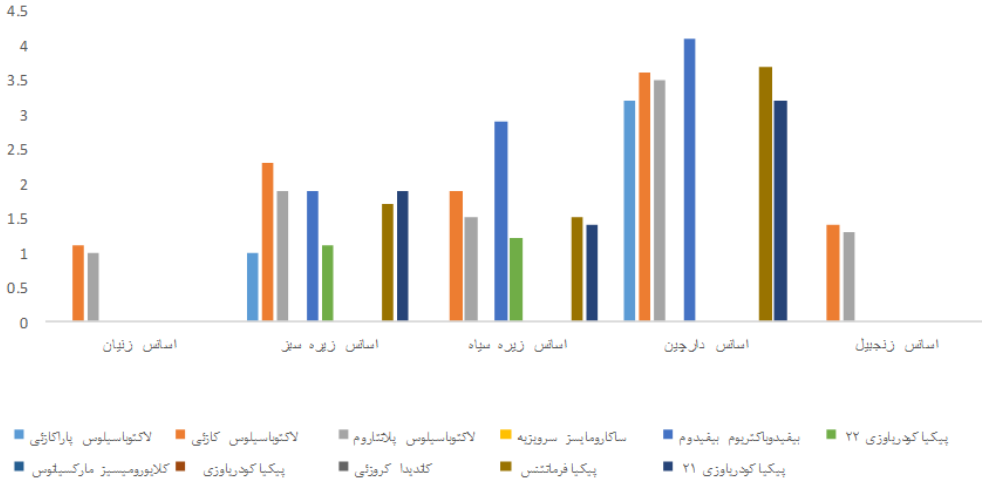
اسانس زنجبیل اثرمهاری روی هیچ یک از باکتری‌های بیماریزای مورد مطالعه نشان نداد اما روی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم اثرات کشندگی نشان داد. در مطالعه‌ای که توسط Malu و همکارانش انجام شد، مشخص شد که عصاره آبی زنجبیل اثرات مهاری قابل ملاحضه‌ای ندارد(26) در مطالعه ما نیز اسانس زنجبیل اثرات مهاری روی باکتری‌های بیماریزای مورد مطالعه نداشته و حتی اثرات منفی روی لاکتوباسیلوس کازئی و پلانتاروم نشان داد. سانس زنیان در این مطالعه اثر مهاری نسبتاً خوبی روی باکتری‌های بیماریزا بجای گذاشت.

جدول شماره 8 : نام و درصد ترکیبات مهم بالای 0/3% در اسانس های مورد استفاده

گیاه	نتایج GC-MS حاصل از اسانس	رفرنس
زنجبیل	آلفا زینجیرن (28,85%)، بتا سیگو فلاندرن (15,65%) آلفا کورکومین (15/12 درصد)، ترانس گاما کادینن (11/88 درصد)، سیس گاما کادینن (5/14 درصد)، بورنئول (2/92 درصد)، لیناالول (1/31 درصد)، آلفا ترپینول (1/18 درصد)، ای - زیترال (1/16 درصد)، زی -زیترال (1/1 درصد)، اندوکاتون (0/77 درصد)، بتا کاریوفیلن (0/76 درصد)، زوئارن (0/48 درصد)، ترنس گاما بیسابولن (0/41 درصد)، بتا سلینن (0/41 درصد)، بتا کوکومین (0/32 درصد)	(22)
زنیان	تیمول (45 درصد)، پراسیمن (25 درصد)، گاما ترپینن (18درصد)، بتا پینن (1/3 درصد)، بتا فلاندرن (0/7 درصد)، سابینن (0/7 درصد) بتامیرسن (0/5درصد)، آلفا ترپینن (0/6 درصد)، ترپینن (0/3 درصد)، آلفا پینن (0,3%)، آلفا نوژن (0,3%)	(23)
زیره سیاه	پروپانول 2-متیل 3- فنیل (26/05 درصد)، گاما ترپینن (21/86 درصد)، 1-فنیل -1- بوتانول (20/76 درصد)، آلفا توجیتال (11/66 درصد)، پی سیمیت (7/11 درصد)، لیمونن (3/53 درصد)، 3- سیکلو پنتیل سیکلو پنتان - ان (2/2 درصد)، 2-بتا پینن (1/32 درصد)، 4-ترپینئول (0/86 درصد)، سابینن (0/75 درصد)، آلفا پینن (0/74 درصد)، آلفا ترپینولن (0/38 درصد)	(24)
زیره سبز	بتا پینن (7/11 درصد)، 1 متیل بتزن (7/73 درصد)، بتا فلاندرن (0/01 درصد)، گاما ترپینن (12/56 درصد)، بی سیکلو ایزو پروپیل (2/76 درصد)، بتزآلدهاید (27,18%)، ایزوپیلایدن (3,77%)، فنیل پروپانول (17,50%)، بتزن متانول (10,82%)	(25)



نمودار شماره 1: قطر هاله عدم رشد اسانس های گیاهی بر روی باکتری های مضر روده بر حسب سانتی متر



نمودار شماره 2 : قطر هاله عدم رشد اسانس های گیاهی بر روی باکتری های مفید روده بر حسب سانتی متر

هرچند که روی شیگلا فلکسنری اثری مهاری خاصی رویت نشد. به عبارت دیگر این اسانس به‌جز روی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم روی سایر باکتری ها اثرات مهاری نداشته و در حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اثرات مهارکنندگی مشاهده شد. اسانس زیره سبز اثر مهاری ضعیفی از خود بروز داد به‌طوری که بر روی باکتری‌های بیماری‌زای لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس کاملا بی اثر بود. البته این اسانس روی لاکتوباسیلوس پاراکازئی، ساکارومایسز سرویزیه، پیکیا کودریاوزی، کلایورومیسیز مارکسیانوس و کاندیدا کروزئی نیز تاثیر معنی داری نشان نداد. حداقل غلظت بازدارندگی این اسانس مربوط به شیگلا فلکسنری با اثرات کشندگی بود. از طرفی، بر روی سایر باکتری‌های

بیماریزا اثرات مهارکنندگی مشاهده شد. به عبارت دیگر، عملکرد این اسانس مشابه اسانس زیره سبز اما با قدرت بیش‌تر بود. از بین چهار اسانس گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق، به نظر می‌رسد که اسانس زنیان و دارچین از پتانسیل بیش‌تری در تعدیل فعالیت باکتری‌های بیماریزای موثر در دیس‌بیوزیس برخوردار بوده و می‌توانند یک گزینه مناسب در ساخت داروی موثر مورد توجه قرار گیرند. به‌عبارت دیگر، تمرکز بر روی این دو گیاه داروئی به‌عنوان عوامل ضد میکروبی جدید علیه باکتری‌های بیماریزای مقاوم با توجه به این امر که کشور ما منبع غنی از آن‌ها می‌باشد، می‌تواند گام مهمی جهت استفاده بهینه از این ثروت ملی محسوب گردد.

این تحقیق اثبات نمود که گونه‌های گیاهی مورد بررسی قابلیت استفاده در فعالیت‌های ضد باکتریایی را دارند. با وجود اثبات خواص ضدمیکروبی اسانس ای استفاده شده در این مطالعه، کاربرد ترکیبات گیاهی با چالش‌های جدی روبه رو می‌باشد. یکی از مهم‌ترین این محدودیت‌ها، اثرگذاری نامطلوب بر ارگان‌های غیرهدف در شرایط موجود زنده است. به‌عبارت دیگر، مصرف این اسانس‌ها در شرایط سنتی به‌صورت خوراکی می‌باشد، درحالی که جهت افزایش نفوذپذیری، به فرمولاسیون و دستگاه‌های پیچیده نیاز است. فرمولاسیون داروهای جدید متنوع‌تر از داروهای شناخته شده بوده و توسعه فرمولاسیون جدید را به دنبال دارد که نیاز به مطالعات بیش‌تر بوده و هزینه بر خواهد بود. همچنین اکسید شدن برخی از مواد موثر موجود در این اسانس‌ها یکی دیگر از محدودیت‌های موجود در طول انجام آزمایش محسوب می‌شود. به عنوان مثال ترکیبات زیست فعال و فرار موجود در زنجبیل مانند جینجرول و شوگاول در برابر نور، حرارت و اکسیداسیون حساس بوده و سریعا ازبین می‌روند(26). پیشنهاد می‌شود تا رسانش مواد موثر این اسانس‌ها با کمک حامل‌های هدفمند نظیر نانو ذرات یا لیپوزوم‌ها انجام پذیرد. همچنین در طب سنتی برای افزایش اثرات سودمند گیاهان دارویی معمولاً استفاده همزمان دو یا چند گیاه توصیه می‌شود. بنابراین انتظار می رود که خاصیت ضدمیکروبی این اسانس‌ها یک بار دیگر به صورت اثرات هم‌افزایی (Synergic effect) مورد مطالعه قرار گیرد. از دیگر محدودیت‌های موجود در استفاده از اسانس‌های گیاهی به عنوان مواد ضدمیکروبی می‌توان به مشکلاتی مانند فرآیند اکسیداسیون، تبخیر شدن اسانس، تغییر رایحه در طول انحلال و واکنش دادن با مواد دیگر اشاره نمود که به نظر می‌رسد با کپسوله کردن اسانس‌ها تا حدود زیادی می‌توان این مشکلات را برطرف نمود. در نهایت جداسازی، تخلیص و بررسی تک به تک مواد موثر هر یک از گیاهان یکی دیگر از مهم‌ترین محدویت‌های موجود در این مطالعه محسوب می‌گردد که به علت زمان بر و پر هزینه بودن، خارج از حوصله این مطالعه بود و در تحقیقات آینده بررسی این موضوع پیشنهاد می‌گردد.

اعتقاد بر این است که بسیاری از گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات طبیعی با فعالیت بالقوه آنتی‌بیوتیکی می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج باشند. تحقیقات ما نشان داد، اگر چه اسانس ای مربوط به زیره سیاه و زنجبیل اثرات ضد بیماری قابل ملاحظه‌ای ندارند، با این وجود اسانس زنیان با بیش‌ترین اثر مهاری روی باکتری‌های بیماریزا و همزمان کم‌ترین اثر مهارکنندگی روی باکتری‌های مفید، عملکرد بسیار خوبی از خود نشان می‌دهد. اسانس دارچین اثرات مهاری قابل ملاحظه‌ای روی باکتری‌های بیماریزا نشان داد هر چند این اسانس روی باکتری‌های مفید نیز اثرات مهاری دارد اما با توجه به این‌که اثر مهاری بیش‌تر روی خانواده لاکتوباسیلوس‌ها بود و اثرات چندانی روی بقیه باکتری‌های مفید نداشت، مطالعات بیش‌تر جهت ساخت فرمولاسیون داروئی موثر از آن می‌تواند نتایج خوبی به همراه داشته باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گرفت که این دو گیاه می‌توانند به‌عنوان یک گزینه مناسب جهت ساخت داروی ضد میکروبی با منشاء گیاهی و عوارض دارویی کم‌تر درجهت درمان عفونت‌های روده‌ای مزمن بسیار حائز اهمیت باشند.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکتری عمومی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با شماره پایان نامه 3960 و به کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1397.156 می‌باشد. نویسندگان از آقای دکتر رضا کلانتری در انتخاب صحیح واژگان فارسی جهت معادل سازی با واژگان انگلیسی کمال تقدیر و تشکر را می نمایند

References

1. Guzman JD, Gupta A, Bucar F, Gibbons S, Bhakta S. Antimycobacterials from natural sources: ancient times, antibiotic era and novel scaffolds. Front Biosci 2012; 17(5): 1861-1881.
2. Campanini-Salinas J, Andrades-Lagos J, Mella-Raipan J, Vasquez-Velasquez D. Novel classes of antibacterial drugs in clinical development, a hope in a post-antibiotic era. Current Topics in Medicinal Chemistry 2018; 18(14): 1188-1202
3. Lee SJ, Bose S, Seo JG, Chung WS, Lim CY, Kim H. The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: a randomized double-blind controlled clinical trial. Clin Nutr 2014; 33(6): 973-981.
4. Hamedi A, Zarshenas MM, Sohrabpour M, Zargaran A. Herbal medicinal oils in traditional Persian medicine. Pharmaceutical Biology 2013; 51(9): 1208-1218.
5. Mohammadzadeh F, Monirifar H, Saba J, Valizadeh M, Haghighi AR, Zanjani BM, et al. Genetic variation among Iranian alfalfa (Medicago sativa L.) populations based on RAPD markers. Bangladesh Journal of Plant Taxonomy 2011; 18(2): 93-104.
6. Eyvazi S, Vostakolaei MA, Dilmaghani A, Borumandi O, Hejazi MS, Kahroba H, et al. The oncogenic roles of bacterial infections in development of cancer. Microbial Pathogenesis 2020; 141(8): 104019.
7. Azargun R, Gholizadeh P, Sadeghi V, Hosainzadegan H, Tarhriz V, Memar MY, et al. Molecular mechanisms associated with quinolone resistance in Enterobacteriaceae: review and update. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2020; 114(10): 770-781.
8. Ahangari H, Tarhriz V, Tarighat A, Hashemi M, Ehsani A. Exploring the Safety and Hygiene of Enteral Tube Feedings by 16S rRNA Based Sequencing: A Risk Factor in Healthful Nutrition. Arch Pharma Pract 2020; 11(S1): 129-135.
9. Simrén M. IBS with intestinal microbial dysbiosis: a new and clinically relevant subgroup? Gut 2014; 63(11): 1685-1686.
10. Abdullahi A, Khairulmazmi A, Yasmeen S, Ismail I, Norhayu A, Sulaiman M, et al. Phytochemical profiling and antimicrobial activity of ginger (Zingiber officinale) essential oils against important phytopathogens. Arabian Journal of Chemistry 2020; 13(11): 8012-8025.
11. Al-Duboni G, Osman MT, Al-Naggar R. Antimicrobial activity of aqueous extracts of cinnamon and ginger on two oral pathogens causing dental caries. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 2013; 4(3): 957-965.
12. Wang X, Shen Y, Thakur K, Han J, Zhang J-G, Hu F, et al. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Molecules 2020; 25(17): 3955.

13. Tarhriz V, Eyvazi S, Shakeri E, Hejazi MS, Dilmaghani A. Antibacterial and antifungal activity of novel freshwater bacterium Tabrizicola aquatica as a prominent natural antibiotic available in Qurugol Lake. Pharmaceutical Sciences 2020; 26(1): 88-92.
14. Madhumathi V, Deepa P, Jeyachandran S, Manoharan C, Vijayakumar S. Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from freshwater lake. Int J Microbiol Res 2011; 2(3): 213-216.
15. Davis CP. Normal flora. Medical Microbiology 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
16. Vaishnavi C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. Indian J Med Microbiol 2013; 31(4): 334-342.
17. Hooks KB, O'Malley MA. Dysbiosis and its discontents. MBio 2017; 8(5): e01492.
18. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals 2013; 6(12): 1451-1474.
19. Oulkheir S, Aghrouch M, El Mourabit F, Dalha F, Graich H, Amouch F, et al. Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. Journal of Diseases and Medicinal Plants 2017; 3(2-1): 1-5.
20. Soleimani N, Ebraze N. Evaluate anti-bacterial effects of cinnamomun verum and ferula gummosa essential oil on some pathogen gram positive and negative bacteria. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 2016; 6(23): 87-94 (Persian).
21. Sebiomo A, Awofodu A, Awosanya A, Awotona F, Ajayi A .Comparative studies of antibacterial effect of some antibiotics and ginger (Zingiber officinale) on two pathogenic bacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobials 2011; 3(1): 18-22.
22. Amiri H, Mohammadi M, Sadatmand S, Taheri E. Study the Chemical Composition of Essential Oil of Ginger (*Zingiber officinale*) and Antioxidant and Cell Toxicity. J Med Plants 2016; 15(58): 89-98 (Persian).
23. Ashrafi Tamai I, Zahraei Salehi T, Khosravi AR, Sharifzadeh A, Balal A. Chemical composition and anti-candida activity of trachyspermum ammi essential oil on azoles resistant candida albicans isolates from oral cavity of hiv+ patients. Journal of Medicinal Plants 2013; 12(46): 137-149 (Persian).
24. Taherkhani P, Noori N, Akhondzadeh Basti A, Gandomi H, Alimohammadi M. Antimicrobial Effects of Kermanian Black Cumin (*Bunium persicum* Boiss.) Essential Oil in Gouda Cheese Matrix. J Med Plants 2015; 14(54): 76-85 (Persian).
25. Moradi B, Mashak Z, Akhondzadeh Basti A, Moradi B, Barin A. The Survey of the Effect of Cuminum cyminum L. Essential Oil on the Growth of Bacillus cereus in a Food Model System. J Med Plants 2012; 11(41): 93-102 (Persian).
26. Malu SP, Obochi GO, Tawo EN, Nyong BE. Antibacterial activity and medicinal properties of ginger (Zingiber officinale). Global Journal of Pure and Applied Sciences. 2009; 15(3): 365-368.