

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

Vahideh Tarhiz¹,
Ahmad Yari Khosroushahi²,
Leila Ebrahimi Ghasor³,
Babak Elyasifar⁴,
Azita Dilmaghani⁵

¹ Assistant 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 prepared 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, dysbiosis 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)

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

وحیده طرح ریز¹
احمد یاری خسروشاهی²
لیلا ابراهیمی قصور³
بابک الیاسی فر⁴
آریتا دیلمقانی⁵

چکیده

سابقه و هدف: امروزه مصرف نادرست آنتی بیوتیک ها با بهم زدن تعادل میکروبی بدن، زمینه ساز بروز بیماری های جدید شده اند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاهان زنجبیل، دارچین، زنیان، زیره سبز و زیره سیاه بر روی برخی باکتری های ایجاد کننده دیس بیوزیس جهت تعدیل فلور میکروبی روده در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها: اسانس گیاهان دارویی از طریق تقطیر به روش بخار غیرمستقیم تهیه و میکروب ها از مرکز کلکسیون (IROST) خریداری شدند. بعد از آماده شدن محیط کشت ها، چاهک گذاری انجام شد و بعد از 24 ساعت هاله عدم رشد اندازه گیری شد. جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی مخمرها و باکتری های بیماریزا، به ترتیب از روش ماکرودیولوشن و میکرودیولوشن استفاده شد. نتایج حاصل، طبق استانداردهای CLSI تفسیر شد.

یافته ها: نتایج مطالعه نشان داد که اسانس دارچین بیش ترین اثر مهارتی را بر روی همه باکتری های بیماریزا داشته است. اسانس زنیان نیز بجز شیگلا فلکسنتری روی سایر باکتری های بیماریزا اثر مهارتی متوسطی داشت. اسانس زیره سبز و زیره سیاه، مشابه عمل کرده و اسانس زنجبیل هیچ اثری روی هیچ کدام از باکتری های بیماریزا نشان نداد.

استنتاج: با توجه به نتایج به دست آمده اسانس زنیان با بیش ترین اثر مهارتی روی باکتری های بیماریزا بسیار خوب عمل کرده است. اسانس دارچین نیز اثر مهارتی بسیار خوبی بر روی باکتری های بیماریزا و عدم بازدارندگی روی برخی باکتری های مفید نشان داد، لذا این گیاهان می توانند با تعدیل فعالیت باکتری های بیماریزای موثر در دیس بیوزیس، برای ساخت داروی موثر، امیدوار کننده باشند.

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

مقدمه

امروزه به علت بروز مقاومت های میکروبی، استفاده از گیاهان و ترکیبات آن ها به عنوان آنتی بیوتیک های رایج مطرح است. نتایج بسیاری از مطالعات نشان می دهد که اسانس برخی از گیاهان توانایی مهار رشد

E-mail: dilmaghania@tbzmed.ac.ir

مؤلف مسئول: آریتا دیلمقانی - تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی

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 دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
4. دکترای بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
5. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

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

میکروارگانسیم‌ها 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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. به طوری 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 آنجایی که گیاهان مفید دارویی در کشور ما فراوان می‌رویند، بررسی اثرات ضد میکروبی 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، آرتريت 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 میکروارگانسیم‌های 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 اشیریشیاکلی، سالمونلا، کلبسیلا، شیگلا و غیره می‌توانند اثر داشته باشند (7-9).

دیس بیوزیس (Dysbiosis) یا به معنی به هم خوردن توازن باکتری‌های روده است. روده بزرگ میزبان هزاران میکروارگانسیم 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 رساننده 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 زنجبیراسه (*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

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

کد PTCC	نام انگلیسی	نام فارسی
PTCC 1290	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	کلزیلا پنومونه
PTCC 1234	<i>Shigella Flexneri</i>	شیگلا فلکسنری
PTCC 1811	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	سودوموناس آئروژینوزا
PTCC 1163	<i>Listeria monocytogenes</i>	لیستریا مونوسیتوژنز
PTCC 1330	<i>Escherichia coli</i>	اشریشیا کلی
PTCC 1015	<i>Bacillus cereus</i>	باسیلوس سرئوس
PTCC 0	<i>Lactobacillus paracasei</i>	لاکتوباسیلوس پاراکازی
PTCC 1608	<i>Lactobacillus casei</i>	لاکتوباسیلوس کازی
PTCC 1058	<i>Lactobacillus plantarum</i>	لاکتوباسیلوس پلانٹاروم
PTCC 5052	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ساکارومایسز سرویزیه
PTCC 1644	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	بیفیدوباکتریوم بیفیدوم
PTCC 0	<i>Pichia kudriavzevii 22</i>	پیکیا کودریاویزوی 22
PTCC 5188	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	کلایورومایسس مارکسیانوس
PTCC 0	<i>Pichia kudriavzevii</i>	پیکیا کودریاویزوی
PTCC 5295	<i>Candida krusei</i>	کاندیدا کروزئی
PTCC 5296	<i>Pichia fermentans</i>	پیکیا فرمانتس
PTCC 0	<i>Pichia kudriavzevii 21</i>	پیکیا کودریاویزوی 21

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 ماکرودیلوشن و میکرویدیلوشن جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی یا minimum inhibitory concentration (MIC) و حداقل غلظت کشندگی یا Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC) رقیق سازی با 3 میلی لیتر از اسانس در 3/3 میلی لیتر اتانول و 4/7 میلی لیتر توئین 80 انجام شد.

تعیین هاله عدم رشد باکتری های بیماریزا در برابر اسانس های گیاهی

در روش چاهک گذاری، ابتدا به وسیله انتهای پیت پاستور چاهک هایی در محیط کشت تعبیه شد. سپس 100 میکرو لیتر از اسانس، به طور جدا گانه در چاهک ها ریخته شده و در هر ظرف کشت یک چاهک به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، با حفظ شرایط استاندارد در انجام تست های حساسیتی، از محلول میکروبی با استاندارد

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

مواد و روش ها

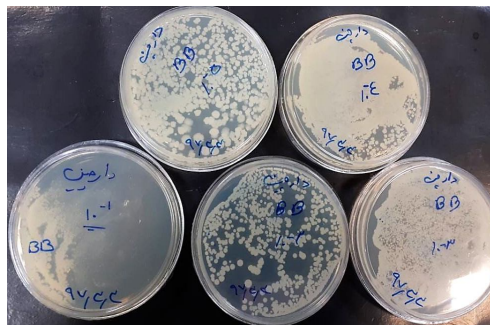
آماده سازی باکتری های بیماریزا

باکتری های بیماریزا به صورت خالص و لیوفلیزه از مرکز نگهداری میکروب های صنعتی ایران خریداری و در 20 میلی لیتر محیط کشت LB در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه (Incubated) قرار گرفتند (جدول شماره 1). ابتدا نمونه حاصل به محیط کشت جامد مربوطه منتقل و تحت شرایط فوق تکثیر شدند. سپس جهت تهیه محلول میکروبی در مجاورت شعله از کشت 24 ساعته میکروب های خالص در لوله های آب مقطر استریل قرار داده شد و کدورت حاصل از محلول میکروبی معادل استاندارد 0/5 مک فارلند ثبت شد.

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 ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های مفید به روش ماکرودایلوشن براث

برای تعیین حداقل 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 جالوله‌ای قرار داده و از شماره 1 تا 12 شماره گذاری شد و این مجموعه هم دوباره در اتوکلاو ضد عفونی شد (تصویر شماره 1) (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 میکروودایلوشن براث

ابتدا اسانس گیاهی رقیق‌سازی شد تا اسانس با غلظت 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست 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 میلی‌لیتر 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 کاملاً 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 غلظت کشندگی این اسانس در نظر گرفته شد (14).

یافته ها

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

زنجبیل اثر مهارى روى هيچيك از باكتري‌هاى بيمارى‌زاي مورد مطالعه نشان نداد. اسانس زنيان روى شيگلا فلکسنرى اثر مهارى نشان نداد، اما روى ساير باكتري‌هاى بيماريزا اثر متوسط با قطر هاله عدم رشد از 0/8 تا 1/8 سانتى‌متر نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگى براى اين اسانس، 50 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر بود. اسانس زيره سبز روى باكتري‌هاى بيماريزاي ليستريا مونوسيتوزنز، اشريشيا كلئى و باسيلوس سرئوس اثر مهارى نشان نداد و قطر هاله عدم رشد در ساير باكتري‌هاى بيمارى‌زاي بين 1/2 تا 1/6 سانتى‌متر اندازه‌گيرى شد. حداقل غلظت بازدارندگى براى اين اسانس روى كلبيلا پنومونيا 25 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر و براى ساير باكتري‌هاى بيمارى‌زاي 50 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر بود. در مورد اسانس زيره سياه نيز همانند زيره سبز روى باكتري‌هاى بيمارى‌زاي ليستريا مونوسيتوزنز، اشريشيا كلئى و باسيلوس سرئوس اثر مهارى نشان نداد و قطر هاله عدم رشد در ساير باكتري‌هاى بيماريزا بين 1/2 تا 1/5 سانتى‌متر اندازه‌گيرى شد. حداقل غلظت بازدارندگى براى اين اسانس روى باكتري‌هاى بيمارى‌زاي 50 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر بود (جداول شماره 2، 3 و 4).

در بررسى اثرات اسانس‌هاى مورد مطالعه روى باكتري‌هاى مفيد روده، دارچين بيش‌ترين اثرات مهاركنندگى نشان داد. هرچند روى ساكارومايسز سرويزيه، پيكيا كودرياوزى و پيكيا كودرياوزى 22، كلايورومييسيز ماركسيانوس و كانديدا كروزي اثرات مهارى ديده نشد.

قطر هاله عدم رشد اندازه‌گيرى شده مربوط به اين اسانس در ساير باكتري‌ها بين 3/2 تا 4/1 سانتى‌متر مشاهده شد. حداقل غلظت بازدارندگى براى اين اسانس روى بيفيدوباكتريوم بيفيدوم 3/125 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر و پيكيا فرمانتنس 6/25 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر و پيكيا كودرياوزى 21 ميزان 12/5 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر و ساير باكتري‌هاى بيماريزا 25 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر بود. اسانس زنجبيل اثر مهارى روى لاكتوباسيلوس كازئى و لاكتوباسيلوس پلانئاروم با قطر هاله عدم رشد 1/4 و 1/3 سانتى‌متر و حداقل غلظت بازدارندگى 25 ميلي‌گرم بر

ميلي‌ليتر مشاهده شد. اسانس زنيان نيز روى لاكتوباسيلوس كازئى و لاكتوباسيلوس پلانئاروم با قطر هاله عدم رشد 1/1 و 1/0 سانتى‌متر و حداقل غلظت بازدارندگى 50 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر نشان داد. اسانس زيره سبز روى ساكارومايسز سرويزيه، پيكيا كودرياوزى، كلايورومييسيز ماركسيانوس و كانديدا كروزي اثر مهارى نشان نداد. قطر هاله عدم رشد در ساير باكتري‌هاى بيماريزا بين 1/0 تا 2/3 سانتى‌متر اندازه‌گيرى شد. حداقل غلظت بازدارندگى براى اين اسانس روى لاكتوباسيلوس پاراكازئى و لاكتوباسيلوس پلانئاروم 50 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر و براى ساير باكتري‌هاى بيماريزا 25 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر بود. در مورد اسانس زيره سياه روى لاكتوباسيلوس پاراكازئى، ساكارومايسز سرويزيه، پيكيا كودرياوزى، كلايورومييسيز ماركسيانوس و كانديدا كروزي اثر مهارى نشان نداد. قطر هاله عدم رشد در ساير باكتري‌هاى بيماريزا بين 1/2 تا 2/9 سانتى‌متر اندازه‌گيرى شد. حداقل غلظت بازدارندگى براى اين اسانس روى بيفيدوباكتريوم بيفيدوم 12/5 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر و براى لاكتوباسيلوس پلانئاروم 50 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر و براى ساير باكتري‌هاى بيماريزا 25 ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر بود (جداول شماره 5، 6 و 7).

جدول شماره 2: قطر هاله عدم رشد اسانس‌هاى گياهي بر روى باكتري‌هاى مضر روده بر حسب سانتى‌متر

اسانس	اسانس زنيان	اسانس زيره سبز	اسانس زيره سياه	اسانس دارچين	اسانس زنجبيل
كلبيلا پنومونيا	1,8	1,5	1,4	4	0
شيگلا فلکسنرى	0	1,6	1,2	3,9	0
سودوموناس آئروجنوزا	0,9	1,2	1,5	3,5	0
ليستريا مونوسيتوزنز	0,9	0	0	3,1	0
اشريشيا كلئى	1	0	0	3,8	0
باسيلوس سرئوس	0,8	0	0	4,1	0

جدول شماره 3: مقادير حداقل غلظت ممانعت‌كنندگى اسانس‌هاى گياهي در باكتري‌هاى مضر روده بر حسب ميلي‌گرم بر ميلي‌ليتر

اسانس	اسانس زنيان	اسانس زيره سبز	اسانس زيره سياه	اسانس دارچين	اسانس زنجبيل
كلبيلا پنومونيا	50	25	50	25	NI
شيگلا فلکسنرى	-	50	50	12,5	-
سودوموناس آئروجنوزا	50	50	50	25	-
ليستريا مونوسيتوزنز	50	-	-	25	-
اشريشيا كلئى	50	-	-	25	-
باسيلوس سرئوس	50	-	-	25	-

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، سودومونا، 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. با توجه 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 ضد میکروبی آن‌ها جهت تعدیل فلور میکروبی در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. Nazzaro و همکارانش در مطالعه خود، نشان دادند که اسانس گیاهان با دارا بودن ترکیبات ترپنی، ترپنئیدی و فنیل پروپن‌ها می‌توانند

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

اسانس	اسانس	اسانس	اسانس	اسانس
زنیان	زیره سبز	زیره سیاه	دارچین	زنجبیل
کلبسیلا پنومونیا	50	25	50	25
شیگلا فلکسنری	-	50	50	12,5
سودوموناس آبروجنوزا	50	50	50	25
لیستریا مونوسیتوزز	50	-	25	-
اشرشیا کلی	50	-	25	-
باسیلوس سرتوس	50	-	25	-

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

اسانس	اسانس	اسانس	اسانس	اسانس
زنیان	زیره سبز	زیره سیاه	دارچین	زنجبیل
لاکتوباسیلوس پاراکازنی	0	1	0	3,2
لاکتوباسیلوس کازنی	1,1	2,3	1,9	3,6
لاکتوباسیلوس پلانتروم	1	1,9	1,5	3,5
ساکارومایسز سرویزیه	0	0	0	0
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	0	1,9	2,9	4,1
پیکیا کوردیوازی 22	0	1,1	1,2	0
کلایوروسیز مارکیانوس	0	0	0	0
پیکیا کوردیوازی	0	0	0	0
کاندیدا کروزی	0	0	0	0
پیکیا فرمانتس	0	1,7	1,5	3,7
پیکیا کوردیوازی 21	0	1,9	1,4	3,2

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

اسانس	اسانس	اسانس	اسانس	اسانس
زنیان	زیره سبز	زیره سیاه	دارچین	زنجبیل
لاکتوباسیلوس پاراکازنی	-	50	-	25
لاکتوباسیلوس کازنی	50	25	25	25
لاکتوباسیلوس پلانتروم	50	50	50	25
ساکارومایسز سرویزیه	-	-	-	-
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	-	25	12,5	3,125
پیکیا کوردیوازی 22	-	25	25	-
کلایوروسیز مارکیانوس	-	-	-	-
پیکیا کوردیوازی	-	-	-	-
کاندیدا کروزی	-	-	-	-
پیکیا فرمانتس	-	25	25	6,25
پیکیا کوردیوازی 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	اسانس	اسانس	اسانس	اسانس
زنیان	زیره سبز	زیره سیاه	دارچین	زنجبیل
لاکتوباسیلوس پاراکازنی	-	50	-	25
لاکتوباسیلوس کازنی	50	25	25	25
لاکتوباسیلوس پلانتروم	50	50	50	25
ساکارومایسز سرویزیه	-	-	-	-
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	3,125	25	12,5	3,125
پیکیا کوردیوازی 22	-	25	25	-
کلایوروسیز مارکیانوس	-	-	-	-
پیکیا کوردیوازی	-	-	-	-
کاندیدا کروزی	-	-	-	-
پیکیا فرمانتس	6,25	25	25	6,25
پیکیا کوردیوازی 21	3,125	25	25	12,5

بیوزیس در شرایط آزمایشگاهی بررسی شود. برای تعدیل دیس بیوزیس اسانس 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 بیش‌ترین اثر مهاری بر روی همه باکتری‌های بیماری‌زا دارد. البته لازم بذکر می‌باشد که در مورد باکتری‌های مفید نیز دارچین بیش‌ترین اثرات مهارکنندگی را نشان داد. هر چند روی ساکارومایسس سرویزیه، پیکیا کودریاویزی و پیکیا کودریاویزی 22، کلاپورومیسیز مارکسیانوس و کانیدیدا کروزی 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 اثر مهاری 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 ملاحظه‌ای 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. اسانس زینان در این مطالعه اثر مهاری نسبتاً خوبی روی باکتری‌های بیماری‌زا بجای گذاشت.

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

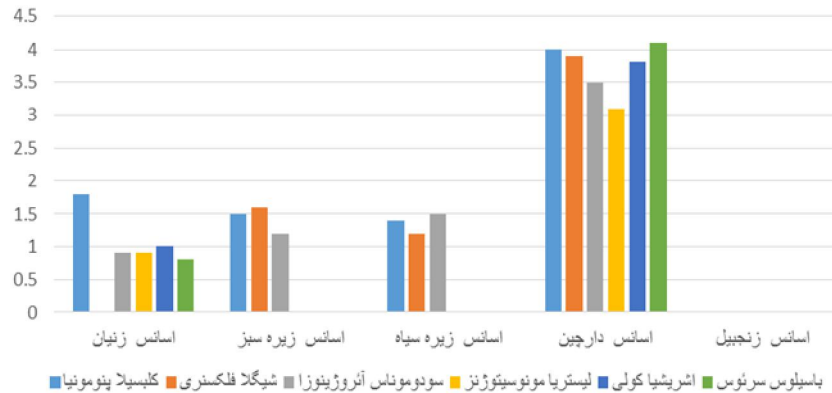
Oulkheir و همکارانش اعلام کردند که اسانس دارچین اثرات بارز مهاری روی تمامی میکروب‌ها دارند و قطر هاله عدم رشد از 26 تا 32 میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اسانس آویشن و میخک نیز اثرات نسبتاً خوب مهاری با قطر هاله عدم رشد 16 تا 22 میلی‌متری نشان دادند. این در حالی بود که اثر مهاری خاصی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا 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 ضد میکروبی 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).

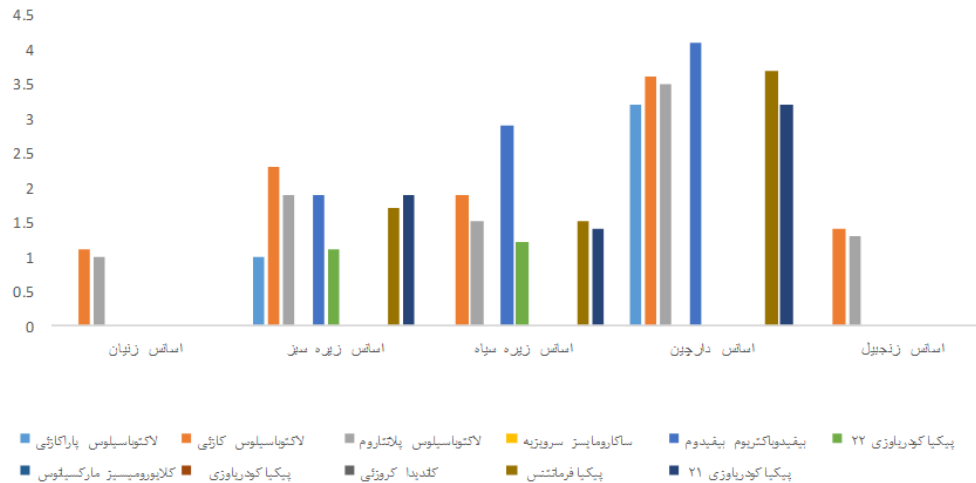
در این تحقیق سعی بر آن شده است تا اثرات ضد میکروبی اسانس‌های چهار گیاه مهم زنجبیل، دارچین، زینان و زیره بر روی باکتری‌های بیماری‌زای دخیل در دیس

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

گیاه	نتایج GC-MS حاصل از اسانس	رفرنس
زنجبیل	آلفا زینچیرن (28.85)، بتا سیگلو فائرن (15.65%)، آلفا کورکومین (15/12)، ترانس گاما کادین (11/88)، سیس گاما کادین (5/14)، بورنول (2/92)، لیاول (1/31)، آلفا ترینول (1/18)، ای - زیرال (1/16)، دی - زیرال (1/11)، اندوکتون (0/77)، بتا کاروفیلن (0/76)، زوقرن (0/48)، ترنس گاما سیلین (0/41)، پالمین (0/41)، بتا کوکومین (0/32) درصد	(22)
زینان	تیمول (45 درصد)، پراسمین (25 درصد)، گاما ترپین (18 درصد)، بتا پین (1/3)، بتا فلاندن (0/7)، ساینین (0/7)، پائیرسن (0/6)، آلفا ترپین (0/6)، ترپین (0/3)، آلفا پین (0/3)، آلفا نوزن (0/3)	(23)
زیره سیاه	پروپانول 2-سیتل 3-فیل (26/05 درصد)، گاما ترپین (21/86)، 1-فیل 1-پوتانول (20/76) درصد، آلفا توجیتال (11/66) درصد، پی سیپیت (7/11) درصد، لیمونن (3/53) درصد، 3-سیکلو پنتیل سیکلو پتان - ان (2/2) درصد، 2-پتا پین (1/32) درصد، 4-ترپینول (0/86) ساینین (0/75) درصد، آلفا پین (0/74) درصد، آلفا ترپینول (0/38) درصد	(24)
زیره سبز	بتا پین (7/11) درصد، 1-سیتل بز (7/73) درصد، بتا فلاندن (0/01) درصد، گاما ترپین (12/56) درصد، پی سیکلو ایزو پروپیل (2/76) درصد، بز آلدیاید (27.18)، ایزوپیلایدن (3.77%)، فیل پروپانول (17.50%)، بز نئول (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

و کاندیدا کروژنی مشاهده نشد. در حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اثرات مهارکنندگی مشاهده شد. در نهایت، اسانس زیره سیاه روی باکتری های بیماریزا اثر مهارتی ضعیفی نشان داد به طوری که حتی بر روی باکتری های بیماریزای لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس کاملاً بی اثر بود. البته این اسانس روی لاکتوباسیلوس پاراکازئی، ساکارومایسز سروزیه، پیکیا کودریاوی، کلاپورومیسز مارکسیانوس و کاندیدا کروژنی نیز تاثیر معنی داری نشان نداد. حداقل غلظت بازدارندگی این اسانس مربوط به شیکلا فلکسنری با اثرات کشندگی بود. از طرفی، بر روی سایر باکتری های

هر چند که روی شیکلا فلکسنری اثری مهارتی خاصی رویت نشد. به عبارت دیگر این اسانس به جز روی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم روی سایر باکتری ها اثرات مهارتی نداشته و در حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اثرات مهارتی مشاهده شد. اسانس زیره سبز اثر مهارتی ضعیفی از خود بروز داد به طوری که بر روی باکتری های بیماریزای لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیا کلی و باسیلوس سرئوس بی اثر بود. همچنین اثرات مهارتی اسانس بر روی باکتری های مفید نیز ناچیز بود و تاثیر معنی داری بر روی ساکارومایسز سروزیه، پیکیا کودریاوی، کلاپورومیسز مارکسیانوس

بیماریا اثرات مهارکنندگی مشاهده شد. به عبارت دیگر، عملکرد این اسانس مشابه اسانس زیره سبز اما با قدرت بیش تر بود. از بین چهار اسانس گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق، به نظر می‌رسد که اسانس زنیان و دارچین از پتانسیل بیش تری در تعدیل فعالیت باکتری‌های بیماریزای موثر در دیس‌بیوزیس برخوردار بوده و می‌توانند یک گزینه مناسب در ساخت داروی موثر مورد توجه قرار گیرند. به عبارت دیگر، تمرکز بر روی این دو گیاه دارویی به عنوان 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 ضد میکروبی 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. به عبارت دیگر، مصرف این اسانس‌ها در شرایط سنتی به صورت 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 بیش تر 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 سریعاً از بین می‌روند (26). پیشنهاد می‌شود تا سانس 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 می‌رود که خاصیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 محدودیت‌های موجود در این مطالعه محسوب می‌گردد که به علت زمان بر و پرهزینه 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 بیش ترین اثر مهار روی باکتری‌های بیماریزای همزمان کم‌ترین اثر مهارکنندگی روی باکتری‌های مفید، عملکرد بسیار خوبی از خود نشان می‌دهد. اسانس دارچین اثرات مهارتی قابل ملاحظه‌ای روی باکتری‌های بیماریزای نشان داد هر چند این اسانس روی باکتری‌های مفید نیز اثرات مهارتی دارد اما با توجه به این که اثر مهارتی بیش تر روی خانواده لاکتوباسیلوس‌ها بود و اثرات چندانی روی بقیه باکتری‌های مفید نداشت، مطالعات بیش تر جهت ساخت فرمولاسیون دارویی موثر از آن می‌تواند نتایج خوبی به همراه داشته باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این دو گیاه می‌توانند به عنوان یک گزینه مناسب جهت ساخت داروی ضد میکروبی با منشأ گیاهی و عوارض دارویی کم‌تر در جهت 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 می باشد.

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

- 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.
- 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
- 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.
- Hamed A, Zarshenas MM, Sohrabpour M, Zargaran A. Herbal medicinal oils in traditional Persian medicine. *Pharmaceutical Biology* 2013; 51(9): 1208-1218.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Simrén M. IBS with intestinal microbial dysbiosis: a new and clinically relevant subgroup? *Gut* 2014; 63(11): 1685-1686.
- 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.
- 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.
- 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, Aghrouh 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.