

ارزیابی اثر عصاره زنیان بر باکتری‌های پروبیوتیک استرپتوکوکوس

سالیاریوس و بیفیدوباکتریوم در شرایط *in vitro*

محمدعلی صادقی^۱، داریوش مینایی طهرانی^۲، مجتبی محمدزاده وظیفه^{۳*}، نگین شکراله زاده^۴

چکیده

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده با خواص مفید برای سلامتی، نقش کلیدی در حفظ تعادل میکروبیوتای دهان و روده ایفا می‌کنند. با این حال، قرارگیری این باکتری‌های سودمند در معرض ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی ممکن است فعالیت آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی زنیان (*Trachyspermum ammi*) بر سویه‌های پروبیوتیک استرپتوکوکوس سالیاریوس K12، استرپتوکوکوس سالیاریوس M18 و بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12 در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. عصاره متانولی زنیان با استفاده از دستگاه سوکسله استخراج و در غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. اثرات بازدارندگی عصاره به سه روش انتشار چاهک (Well Agar Diffusion)، انتشار دیسک (Disk Diffusion) و تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که در هیچ‌یک از غلظت‌های آزمایش‌شده، عصاره زنیان تأثیر بازدارنده یا کشنده‌ای بر رشد سویه‌های پروبیوتیک ندارد (MIC, MBC > 400 mg/ml). این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات زیست‌فعال زنیان (مانند تیمول و کارواکرول)، با وجود خواص ضد میکروبی قوی علیه پاتوژن‌های دهانی، برای پروبیوتیک‌های مورد مطالعه بی‌خطر هستند. بنابراین، استفاده همزمان از این عصاره و پروبیوتیک‌ها در فرمولاسیون محصولات بهداشت دهان (مانند خمیردندان، دهان‌شویه و قرص‌های جویدنی) می‌تواند راهکاری نوین برای مهار پاتوژن‌ها و حفظ سلامت میکروبیوتای دهان باشد. این مطالعه نخستین گزارش از ایمنی عصاره زنیان برای پروبیوتیک‌های کلیدی دهان را ارائه می‌دهد و زمینه را برای تحقیقات آینده در زمینه توسعه درمان‌های ترکیبی مبتنی بر گیاهان دارویی و پروبیوتیک‌ها فراهم می‌سازد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، عصاره متانولی زنیان، فعالیت ضدمیکروبی، سلامت دهان و دندان، استرپتوکوکوس سالیاریوس

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده ای تلقی می‌شوند که در صورت مصرف به اندازه کافی، سلامتی را برای میزبان به ارمغان می‌آورند، به دلیل نقش آن‌ها در بهبود سلامت دستگاه گوارش، تقویت سیستم ایمنی و ممانعت از کلونیزاسیون پاتوژن‌ها، مورد توجه دانشمندان قرار گرفته‌اند.^(۱) در میان این میکروب‌های مفید، سویه‌های خاصی از باکتری‌های پروبیوتیک مانند استرپتوکوکوس سالیاریوس K12 (*Streptococcus K12* salivarius) و استرپتوکوکوس سالیاریوس M18 (*Streptococcus salivarius M18*) می‌توان اشاره کرد. این دو باکتری با مهار باکتری‌های بیماری‌زا و تعدیل میکروبیوتای تنفسی فوقانی می‌توانند به بهبود سلامت دهان و دندان کمک کنند.^(۲، ۳) همچنین بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12 (*Bifidobacterium lactis BB12*)، که به طور گسترده در محصولات لبنی استفاده می‌شود، در بهبود عملکرد سد روده و کاهش علائم عدم تحمل لاکتوز مؤثر بوده است.^(۴) با این حال، علیرغم مزایای اثبات‌شده، بقا و فعالیت سویه‌های پروبیوتیک ممکن است در اثر قرارگیری در معرض عوامل ضدمیکروبی، از جمله ترکیباتی که از منابع طبیعی استخراج می‌شوند، به خطر بیفتد.

ترکیبات مشتق‌شده از گیاهان مدت‌هاست که به دلیل خواص ضدمیکروبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در مواجهه با افزایش مقاومت ضدمیکروبی، به عنوان جایگزین‌هایی برای آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی مطرح شده‌اند. زنیان (*Trachyspermum ammi* (ajwain)) یک گیاه دارویی سنتی با فعالیت ضدمیکروبی قوی است که این ویژگی عمدتاً به

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۱۲

۱. گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ

۲. گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

۳. مرکز خدمات پژوهش صنایع غذایی آرمان هدایت نوش البرز، تهران، ایران mojtaba.duty@yahoo.com

۴. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

ترکیبات زیست فعال آن، ازجمله تیمول و کارواکرول، نسبت داده می شود. این ترکیبات با ایجاد اختلال در غشای سلولی میکروبها، رشد آن ها را مهار می کنند (۵).

عصاره متانولی زنبان، به ویژه، اثربخشی گسترده ای را در برابر پاتوژن هایی مانند اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده است (۶). با این حال، اثرات بازدارندگی بالقوه چنین عصاره هایی بر روی باکتری های پروبیوتیک ناشناخته باقی می ماند و نگرانی هایی را در مورد پیامدهای ناخواسته بر تعادل میکروبیوتای روده و دهان ایجاد می کند.

اگرچه عوامل ضد میکروبی طبیعی اغلب به عنوان جایگزین های ایمن تر در نظر گرفته می شوند، اما فعالیت غیر اختصاصی آن ها ممکن است میکروب های مفید و پروبیوتیک های ضروری برای سلامت میزبان را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات اخیر نشان داده اند که برخی عصاره های گیاهی، ازجمله عصاره های پونه کوهی و سیر، می توانند رشد پروبیوتیک ها را مهار کنند، که این مسئله بر لزوم ارزیابی های سویه محور تأکید دارد (۷، ۸). با وجود پتانسیل درمانی زنبان، تعامل آن با سویه های پروبیوتیک، به ویژه گونه های حیاتی برای فلورهای دهان و روده، همچنان ناشناخته است.

این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی زنبان در شرایط آزمایشگاهی بر سویه های پروبیوتیک *استرپتوکوکوس سالیواریوس K12*، *استرپتوکوکوس سالیواریوس MI8* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12* انجام شد. با ارزیابی مهار رشد و زنده ماندن این سویه ها تحت شرایط آزمایشگاهی کنترل شده، این تحقیق می کوشد مشخص کند که آیا خواص ضد میکروبی عصاره زنبان می تواند عملکرد پروبیوتیک ها را تحت تأثیر قرار دهد. یافته های این مطالعه به بهینه سازی استفاده ایمن از عوامل ضد میکروبی گیاهی و حفظ تعادل میکروبیوتای مفید کمک خواهد کرد.

مواد و روش کار

نمونه گیاهی از عطاری تهیه شد و پس از جمع آوری و انتقال، تحت فرایند تمیزسازی قرار گرفت. سپس، در محیطی وسیع و مناسب، دور از تابش مستقیم نور خورشید، خشک شد. پس از

اطمینان از خشک شدن کامل، اندام های هوایی مانند ساقه و برگ از ریشه ها جدا شدند و نمونه ها برای آسیاب شدن آماده شدند (۹).

به منظور عصاره گیری، از روش سوکسله استفاده شد. در این فرایند، ۳۰ گرم پودر گیاه زنبان خشک شده به همراه ۱۵۰ میلی لیتر متانول به عنوان حلال، به مدت ۸ ساعت در دستگاه عصاره گیر سوکسله قرار گرفت. سپس، حلال در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه روتاری اوپراتور به آرامی تبخیر شد و عصاره تغلیظ شده حاصل گردید (۶، ۹).

عصاره ها با استفاده از حلال ۵٪ دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل شدند. سپس، غلظت های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از این عصاره ها برای انجام آزمایش های تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و انتشار دیسک (Disc Diffusion) تهیه شدند (۱۰).

میکروارگانیزم های مورد بررسی در این مطالعه شامل *استرپتوکوکوس سالیواریوس K12* (DSM 13084) *استرپتوکوکوس سالیواریوس MI8* (ATCC BAA 2593) و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12* (27536) بودند. همچنین از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) به عنوان کنترل استفاده شد. لازم به ذکر است تمامی این سویه ها به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی مرکز ذخایر ژنتیک ایران و شرکت هانسن دانمارک تهیه شدند (۴).

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک فارلند تقریباً 1×10^8 CFU/ml، ۳ تا ۴ کلنی جوان از هر سویه در محیط مولر-هینتون براث کشت داده شد. سپس، کدورت سوسپانسیون حاصل با لوله استاندارد مک فارلند شماره ۰/۵ مقایسه و تنظیم گردید. در مرحله بعد، این سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد تا غلظت نهایی آن به 1×10^6 CFU/ml برسد (۱۱).

برای رسیدن به غلظت 1.5×10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر، سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل لوله ۰/۵ مک‌فارلند به نسبت ۰/۰۱ رقیق شد. به منظور ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره متانولی، چهار غلظت ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه در حلال DMSO ۵٪ آماده گردید. اثر ضد میکروبی عصاره متانولی به سه روش مختلف انتشار چاهک (Well Agar Diffusion)، انتشار دیسک (Disk Diffusion) و رقت‌سازی (Test Dilution) بررسی شد.

در روش انتشار چاهک، ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت 1.5×10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر روی محیط کشت مولر هیتون آگار پخش شده و با استفاده از سوآپ استریل در سه جهت کشت گردید. سپس، چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر و فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر در سطح آگار ایجاد گردید و در ادامه، عصاره به چاهک تزریق شد. شاهد منفی با استفاده از حلال DMSO ۵٪ (که برای حل کردن عصاره‌ها به کار رفته بود) تهیه شد، و از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از آن، میزان تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۱۰).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی، از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. در این روش، سری‌های رقتی با غلظت‌های ۶، ۲، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی در محیط مولر هیتون برآش تهیه گردید. سپس، به هر یک از این رقت‌ها ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی فعال با غلظت 1.5×10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر اضافه شد. همچنین، برای مقایسه، از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده شد. در پایان، لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، لوله‌ها از نظر

کدورت ناشی از رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند و آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (یعنی عدم رشد باکتری) به عنوان MIC تعیین گردید. سپس از تمامی لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونه‌برداری انجام شد و از طریق کشت در پلیت، حداقل غلظت کشنده (MBC) تعیین گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و کمترین غلظت عصاره که پلیت مربوط به آن عدم رشد باکتری مشاهده شد، به عنوان MBC آن ماده در نظر گرفته شد (۱۲).

در روش انتشار دیسک (Disk diffusion)، ابتدا از هر سه سویه باکتری که به غلظت نیم مک‌فارلند رسیده بودند، کشت چمنی انجام شد. سپس دیسک‌های خالی به مدت ۱۵ دقیقه در عصاره متانولی زنیان غوطه‌ور شدند و پس از آن برای ۱۵ دقیقه در زیر هود لامینار قرار گرفتند تا خشک شوند. در مرحله بعد، دیسک‌ها با فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر روی محیط کشت‌ها قرار گرفتند. به عنوان شاهد منفی، از دیسک آغشته به محلول DMSO ۵٪ که برای حل کردن عصاره‌ها استفاده شده بود، بهره‌برداری گردید و دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاهد مثبت به کار رفت. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از آن، کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد به میلی‌متر اندازه‌گیری شدند. برای کاهش خطا در نتایج، هر یک از آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. همچنین نتایج آزمون‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (۱۱، ۱۳).

نتایج

با توجه به نتایج حاصل از روش انتشار چاهک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها، در هیچ کدام پلیت‌های باکتری‌های پروبیوتیک با چاهک حاوی عصاره زنیان، هاله عدم رشدی مشاهده نشد. در حالی که قطر هاله عدم رشد زنیان بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نتایج اثر

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره متانولی زنیان (*Trachyspermum ammi*) در غلظت‌های ۲۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تأثیری در بازدارندگی یا کشندگی رشد سوبه‌های پروبیوتیک *استرپتوکوکوس سالیاریوس* *K12*، *استرپتوکوکوس سالیاریوس* *M18* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* *BB12* نداشته است، در حالی که اثر مهار کنندگی و کشندگی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. نتایج مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در این پژوهش با نتایج تحقیقات پیشین که فعالیت ضد میکروبی زنیان را در برابر پاتوژن‌های دهانی مانند *استرپتوکوکوس موتانس* و *پورفیروموناس ژینژیوالیس* تأیید کرده‌اند، مطابقت دارد (۶). ترکیبات زیست‌فعال موجود در زنیان، به ویژه تیمول و کارواکرول، با آسیب به غشای سلولی پاتوژن‌ها، رشد آن‌ها را مهار می‌کنند؛ اما به نظر می‌رسد این ترکیبات بر پروبیوتیک‌های مفید دهان تأثیر منفی ندارند (۵، ۱۴).

پروبیوتیک‌ها، همچون سوبه‌های *استرپتوکوکوس سالیاریوس* *K12* و *استرپتوکوکوس سالیاریوس* *M18* با تولید باکتریوسین‌هایی مانند *سالیاریسین* *A2* و *B*، از کلونیزاسیون پاتوژن‌ها در حفره دهان جلوگیری می‌کنند (۳، ۱۵). مطالعات بالینی نشان می‌دهند که این سوبه‌ها با کاهش تعداد باکتری *S. mutans* قادر به کاهش خطر پوسیدگی دندان تا ۵۰٪ هستند (۱۶). فعالیت ضد میکروبی انتخابی عصاره زنیان علیه پاتوژن‌ها احتمالاً به تفاوت‌های ساختاری در غشای سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مرتبط است (۱۷، ۱۸). این خاصیت، زنیان را به یک ترکیب ایده‌آل برای استفاده همزمان با پروبیوتیک‌ها تبدیل می‌کند.

مطالعه‌ای اخیراً تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره زنیان را بر کیفیت و ماندگاری سوسیس مرغ تخمیری پروبیوتیک بررسی کرده است. بر اساس یافته‌ها، ترکیب این عصاره با پروبیوتیک

ضد میکروبی عصاره متانولی زنیان با استفاده از روش انتشار چاهک در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد به روش انتشار چاهک

نام باکتری	قطر هاله عدم رشد (میلیمتر)
<i>استرپتوکوکوس سالیاریوس</i> <i>K12</i>	-
<i>استرپتوکوکوس سالیاریوس</i> <i>M18</i>	-
<i>بیفیدوباکتریوم لاکتیس</i> <i>BB12</i>	-
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۱۲/۹۰ ± ۰/۲۸

انتشار دیسک بر چهار سوبه باکتری *استرپتوکوکوس سالیاریوس* *K12*، *استرپتوکوکوس سالیاریوس* *M18* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* *BB12* نشان داد که عصاره متانولی گیاه زنیان هیچ‌گونه اثر مهار کنندگی بر رشد این باکتری‌های پروبیوتیک نداشته است، در حالی که هاله عدم رشد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۵ میلیمتر مشاهده شد.

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک

نام باکتری	قطر هاله عدم رشد (میلیمتر)
<i>استرپتوکوکوس سالیاریوس</i> <i>K12</i>	-
<i>استرپتوکوکوس سالیاریوس</i> <i>M18</i>	-
<i>بیفیدوباکتریوم لاکتیس</i> <i>BB12</i>	-
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۱۵/۱۷ ± ۰/۵۲

همچنین، آزمون‌های حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی گیاه زنیان در غلظت‌های مختلف بر سه سوبه باکتری پروبیوتیکی هیچ‌گونه اثر مهار کنندگی یا کشندگی را نشان نداد. غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه اثر مهار کنندگی و کشندگی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان داد.

دقیق‌تری و با استفاده از مدل‌های کلینیکی مورد بررسی قرار گیرد.

فهرست منابع

1. WHO F. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group: Geneva, Switzerland. 2002.
2. Di Pierro F, Adami T, Rapacioli G, Giardini N, Streitberger C. Clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* in adults. Expert opinion on biological therapy. 2013;13(3):339-43.
3. Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. Future microbiology. 2012;7(12):1355-71.
4. Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. Microorganisms. 2014;2(2):92-110.
5. Singh G, Kapoor I, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CA. Chemistry and antioxidant properties of essential oil and oleoresins extracted from the seeds of tomer (*Zanthoxylum armatum* DC). International Journal of Food Properties. 2013;16(2):288-300.
6. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules. 2009;14(2):586-97.
7. Valenti P, Rosa L, Capobianco D, Lepanto MS, Schiavi E, Cutone A, et al. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. Frontiers in immunology. 2018;9:376.
8. Alves-Santos AM, Sugizaki CSA, Lima GC, Naves MMV. Prebiotic effect of

لاکتوباسیلوس کازنی (*Lactobacillus casei*) نه تنها بر رشد باکتری اثر مهارکنندگی نداشت، بلکه به طور معناداری موجب ارتقای زنده مانی باکتری پروبیوتیک و ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی و حسی محصول شد (۱۹).

ترکیب عصاره زنیان با پروبیوتیک‌ها می‌تواند به عنوان یک استراتژی نوین در فرآیند توسعه و تولید محصولات زیر مورد استفاده قرار گیرد: خمیردندان پروبیوتیک تقویت شده، افزودن *S. salivarius* K12 و M18 به همراه عصاره زنیان، نه تنها از تشکیل پلاک دندان‌های جلوگیری می‌کند، بلکه با کاهش التهاب لثه، سلامت دهان را بهبود می‌بخشد (۲۰، ۲۱). دهانشویه‌های ترکیبی، ترکیبات فرار زنیان (مانند تیمول) به دلیل ویژگی‌های ضدالتهابی و ضدبو، نقش مؤثری در کاهش ژئوبیوت و هالیتوزیس دارند (۲۲، ۲۳). قرص‌های جویدنی، این محصولات می‌توانند همزمان با آزادسازی پروبیوتیک‌ها در دهان، ترکیبات ضدپاتوژنی موجود در عصاره زنیان را نیز انتشار دهند (۲۴، ۲۵). شواهد حاصل از مطالعات *in vitro* و *in vivo* نشان می‌دهد که عصاره زنیان حتی در غلظت‌های بالا (تا ۵۰۰ mg/mL)، سمیت سلولی قابل توجهی ندارد (۱۸).

این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی زنیان در غلظت‌های آزمایش شده (تا ۴۰۰ mg/ml)، هیچ‌گونه اثر بازدارندگی بر پروبیوتیک‌های مورد بررسی نداشته است، در حالی که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تاثیر اثر ضد میکروبی عصاره مورد مطالعه قرار گرفته است. این یافته‌ها استفاده همزمان از عصاره زنیان و پروبیوتیک‌ها را در فرمولاسیون‌های محصولات بهداشت دهان امکان‌پذیر می‌سازد، تا از این طریق با مهار پاتوژن‌ها و حفظ جمعیت میکروبی مفید، سلامت دهان و دندان تقویت شود. همچنین، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، اثرات سینرژیستی این ترکیب در کاهش پوسیدگی دندان و بیماری‌های لثه، به ویژه در حضور پاتوژن‌هایی نظیر *S. mutans*، به‌طور

- dietary polyphenols: A systematic review. *Journal of Functional Foods*. 2020;74:104169.
9. Harborne A. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*: springer science & business media; 1998.
10. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2016;6(2):71-9.
11. Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and laboratory standards institute Wayne, PA; 2020.
12. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008;3(2):163-75.
13. Mohammadzadeh Vazifeh M, Hosseini M, Mohammadi A, Jahanfar M, Maleki H. Evaluation of antimicrobial effects of gouda cheese wax. *Medical Laboratory Journal*. 2021;15(2):18-22.
14. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, del Mar Contreras M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*. 2018;32(9):1675-87.
15. Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, Tagg JR, Thomson WM, Hale JD, et al. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(6):875-84.
16. Di Pierro F, Colombo M, Giuliani M, Danza M, Basile I, Bollani T, et al. Effect of administration of *Streptococcus salivarius* K12 on the occurrence of streptococcal pharyngo-tonsillitis, scarlet fever and acute otitis media in 3 years old children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(21):4601-6.
17. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. 2004;94(3):223-53.
18. Alizadeh Behbahani B, Falah F, Lavi Arab F, Vasiee M, Tabatabaee Yazdi F. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020;2020(1):5190603.
19. Faraji M, Sharifi Soltani M, Ariyaei P. Study of the effects of different concentrations of ajwain extract on the shelf life of probiotic fermented chicken sausage. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 2023.
20. Kraft-Bodi E, Jørgensen M, Keller M, Kragelund C, Twetman S. Effect of probiotic bacteria on oral *Candida* in frail elderly. *Journal of dental research*. 2015;94(9_suppl):181S-6S.
21. Allaker RP, Stephen AS. Use of probiotics and oral health. *Current oral health reports*. 2017;4:309-18.
22. Shekar BRC, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. Herbal extracts in oral health care-A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacognosy reviews*. 2015;9(18):87.
23. Blom T, Slot D, Quirynen M, Van der Weijden G. The effect of mouthrinses on oral malodor: a systematic review. *International journal of dental hygiene*. 2012;10(3):209-22.
24. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2009;51.(1)
25. Zhang Y, Ding Y, Guo Q. Probiotic species in the management of periodontal diseases: an overview. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2022;12:806463.