

ارزیابی آزمایشگاهی تاثیر ضدباکتریایی عصاره آبی سیر بر روی میکروارگانیسم‌های پاتوژن زخم‌ها و جراحات درمانگاهی دامپزشکی

حسین تاجیک^{۱*}، فرنود شکوهی ثابت‌جلالی^۲

۱- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

۲- استادیار، گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

*آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۱۷۷ - ۵۷۱۵۵

تلفن: ۲۷۷۰۵۰۸ (۰۴۴۱)، نمابر: ۲۷۷۱۹۲۶ (۰۴۴۱)

پست الکترونیک: Tajik_H@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۶/۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۸۵/۲/۲۶

چکیده

مقدمه: سیر از جمله گیاهانی است که از دیرباز در جوامع گوناگون به عنوان چاشنی، طعم‌دهنده و گیاه دارویی مورد استفاده بوده است. امروزه با بررسی‌های بیوشیمیایی صورت گرفته ترکیبات متفاوتی را به عنوان مسئول خواص غذایی و دارویی سیر معرفی کرده‌اند از مهم‌ترین خواص مفید ادعا شده در مورد سیر، تاثیرات ضد میکروبی آن است. هدف: انجام این تحقیق ارزیابی پتانسیل مهارت عصاره آبی سیر بر روی میکروارگانیسم‌های پاتوژن جدا شده از زخم‌ها و جراحات درمانگاهی است.

روش بررسی: به منظور انجام این بررسی از سیر تازه تولید شده در مناطق شرق گیلان استفاده شده است. عصاره آبی سیر بر اساس روش Shukla و Taneja^{۱۹} تهیه شد. عصاره مذکور به ترتیب در رقت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد و خالص بر روی میکروارگانیسم‌های کنترل (گروه بهداشت مواد غذایی - دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه) و میکروارگانیسم‌های جدا شده از زخم‌ها و جراحات بالینی (ارجاعی به کلینیک تخصصی دانشکده دامپزشکی - دانشگاه ارومیه) مورد آزمون قرار گرفت. این بررسی با استفاده از آزمون انتشار بر روی پلیت آگار^۱ انجام شده است.

نتایج: براساس یافته‌های حاصل از این تحقیق *Streptococcus pyogenes* حساس‌ترین باکتری نسبت به تاثیر مهارت عصاره آبی سیر بوده است و در مقابل کمترین حساسیت را باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از خود نشان داده است ($p < ۰/۰۵$). البته به طور عام میکروارگانیسم‌های قارچی کمترین حساسیت را به عصاره آبی سیر از خود نشان داده‌اند. همچنین حداقل غلظت مهارت عصاره مذکور (به جز دو مورد) تنها در رقت‌های ۶۰ درصد و بالاتر بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده از این بررسی و سایر گزارش‌های موجود در این زمینه می‌توان عصاره آبی سیر را دارای خواص مهارت بر روی میکروارگانیسم‌های رایج موجب بروز عفونت در موارد درمانگاهی دانست. علی‌رغم این نیاز به انجام تحقیقاتی بالینی و میدانی در این زمینه قبل از ارایه هر گونه توصیه در مورد کاربرد کلینیکی آن شدیداً احساس می‌شود.

کل واژگان: سیر، عصاره آبی، ضد میکروبی، زخم

¹ The agar disk diffusion



مقدمه

در آثار به جای مانده از بسیاری از تمدن‌های کهن، نقش چاشنی‌ها و ادویه علاوه بر کاربرد تغذیه‌ای و طعم‌بخشی مواد غذایی جزیی از رژیم‌های درمانی در طب سنتی آن جوامع نیز محسوب می‌شده‌اند [۱]. سیر^۱ یکی از گیاهان متعلق به خانواده Liliaceae بوده که در واقع از مشهورترین چاشنی‌ها و ادویه‌هایی است که در بسیاری از نقاط جهان به عنوان غذا استفاده می‌شود [۲]. برای قرن‌ها گونه‌های مختلفی از *Allium* به عنوان سبزیجات، ادویه و چاشنی غذایی و همچنین به عنوان یک دارو در طب گیاهی در درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها استفاده می‌شده است [۳]. ابن‌سینا دانشمند و پزشک معروف ایرانی در کتاب قانون خود برای درمان بسیاری از بیماری‌های تب‌دار و عفونی نسخه‌هایی را توصیه می‌کند که ترکیب‌های حاوی سیر، بخش اعظم آن‌ها را تشکیل می‌دهد [۴]. بو و مزه تند و غیرمعمول تعداد زیادی از این گیاهان و کاربردهای مختلف طبی آن‌ها سبب جلب توجه شیمیدان‌ها و فیزیولوژیست‌های گیاهی شده است [۵، ۶، ۷، ۸]. به دلیل خواص طبی و غذایی سیر در طی قرون متمادی کشت آن به سراسر جهان گسترش یافته است [۹، ۱۰]. بیشترین اثرات پیشگیرانه و درمانی سیر، مرتبط با ترکیب‌های ارگانوسفره محلول در آب^۲ و روغن‌های ویژه *specific oil* آن است که ضمناً مسؤول ایجاد طعم و بوی خاص سیر نیز هستند [۱۱، ۱۲].

سیر دارای غلظت غیرمعمولی (۱ - ۳ درصد) از ترکیب‌های ارگانوسفره است و اعتقاد بر این است که خواص درمانی آن تا حد زیادی وابسته به یک نوع خاص از این ترکیبات تحت عنوان تیوسولفات‌ها^۳ است [۱۳، ۱۴، ۱۵]. تیوسولفات‌ها نقش اساسی در خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدتک یاخته سیر دارند به نظر می‌آید که آن‌ها با آنزیم‌های حاوی ترکیب‌های گوگردی میکروارگانیسم‌های پاتوژن وارد واکنش می‌شوند [۱۶].

یکی از مهم‌ترین این تیوسولفات‌ها، یک مولکول گوگردی اکسیژنه بوده که با اقتباس از نام لاتینی گیاه سیر^۱ به نام آلیسین^۲ نامیده شد [۱۷].

سیر همچنین دارای اثرات مفیدی در کاهش کلسترول تام پلاسما^۳، کاهش فشار خون^۴ و کاهش تجمع پلاکت‌ها^۵ [۲]. بررسی‌های زیادی بر روی خواص آنتی‌اکسیدان و آنتی‌میکروبیال سیر و مشتقات آن نظیر *essential oil* و *oleoresin* انجام گردیده است [۱۸].

به طور ویژه، سیر حاوی *the cysteine S-conjugate sulfoxide* به نام *L-alliin* [$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{CO}_2$] یک مشتق بدون بو *allylsulfinothiolated* از سیستئین، این ماده در محیط آزاد تبدیل به چندین آنالوگ *allylpolysulfide* بودار می‌شود به ویژه در حالتی که پیاز آن له شده یا خرد شود و یا بهر نوعی آسیب ببیند [۱۸]. با توجه به تاثیرات مفید درمانی سیر علی‌الخصوص پتانسیل ضدباکتریایی آن، و با عنایت به این نکته که سیر به فراوانی و به سهولت در سرزمین ایران یافت شده و خوشبختانه یکی از چاشنی‌های مورد استفاده فراوان چه به صورت خام و یا فرآوری شده در اغذیه سنتی ایرانی است، انجام بررسی‌های علمی دقیق و موشکافانه خصوصاً در زمینه تاثیرات مفید غذایی و طبی آن می‌تواند جنبه‌های مغفول و مهجور مانده این ماده طبیعی را روشن‌تر ساخته و استفاده وسیع‌تر و هدفمندتر از آن‌را در پی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

سیر تازه از تولیدکنندگان محلی در مناطق شرق گیلان تهیه و پس از تمیز شدن و جدا شدن پوسته خشبی خارجی آن، به طور روزانه جهت تهیه عصاره استفاده می‌شود. پیازهای سیر، له و سپس آسیاب شده و به میزان ۱ گرم از خمیر تهیه شده از سیر تازه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط می‌شدند. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و در درجه حرارت اتاق سانتریفیوژ می‌شد. ماده ته نشین شده دور

¹ *Allium sativum*² Allicin³ Total plasma cholesterol⁴ Blood pressure⁵ Platelet aggregation¹ *Allium sativum* Linn.² Water-soluble organosulfur compounds³ Thiosulfates

هر نمونه ۳ بار تکرار می‌شد. پلیت‌ها به منظور نفوذ عصاره سیر درون آگار طی دوره انکوباسیون به مدت یک شب در حرارت مناسب خود قرار داده شدند و پس از آن میزان نواحی مهاری مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان مناطق مهاری بر اساس میلی‌متر محاسبه و سپس میانگین آن‌ها ثبت می‌گردیدند. آخرین نقطه فعالیت ضدباکتریایی نمونه سیر، بالاترین رقت (حداقل غلظت مهاری)^۱ از آن بود که می‌توانست منطقه مهاری بر روی میکروارگانسیم‌های کنترل ایجاد کند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه^۲ و با حداقل اختلاف معنی‌دار با $p < 0.05$ مورد پذیرش بوده است. این آزمون از طریق نرم‌افزار Minitab (Minitab version 10. 51 xtra, State college, PA) انجام می‌گیرد.

نتایج و بحث

نتایج میانگین مناطق مهاری نمونه‌های مورد ارزیابی و رقت‌های تهیه شده از عصاره آبکی سیر بر روی کشت میکروارگانسیم‌های کنترل و میکروارگانسیم‌های جدا شده از موارد درمانگاهی در نمودار و جدول شماره ۱ آمده است. خواص آنتی‌باکتریایی عصاره سیر له شده مدت‌های طولانی است که شناخته شده است. اعتقاد بر آنست که میزان و گستره ترکیب‌های ضدباکتریایی موجود در سیر بستگی زیادی به محل کشت و تولید آن دارد از آن رو است که امروزه تحقیقات زیادی بر روی سیر تولید شده در مناطق جغرافیایی مختلف انجام گرفته است تاکنون پژوهش مستقلی بر روی خواص ضدباکتریایی سیر منطقه شرق گیلان صورت نگرفته است و تحقیق حاضر می‌تواند نخستین مورد در نوع خود تلقی شود. ترکیب‌های مختلفی از سیر نشان داده شده است که طیف وسیعی از فعالیت ضدباکتریایی بر ضدباکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را دارا هستند باکتری‌هایی مانند *Staphylococcus*، *Salmonella*، *Escherichia*، *Bacillus*، *Proteus*، *Klebsiella*، *Streptococcus*، *Clostridium* حتی باکتری‌های Acid-fast نظیر *Mycobacterium tuberculosis* نیز به تاثیر سیر حساس

ریخته شده و از مایع سطحی حاصله و با آب مقطر استریل رقت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد از عصاره سیر تهیه می‌گردید. پروسه تغلیظ عصاره آبکی سیر بر مبنای روش Shukla و Taneja انجام گرفته است [۱۹]. نمونه‌های آماده شده جهت استریلیزاسیون به مرکز تابش اشعه گاما (سازمان انرژی اتمی جمهوری اسلامی ایران، کارگر شمالی، امیرآباد، تهران، ایران) ارسال و مورد تابش ۲۵ کیلوگری اشعه گاما قرار گرفت. نمونه‌ها ابتدا جهت اطمینان از عدم آلودگی بر روی محیط کشت آگار خون کشت داده شدند. سپس ۲۰ نمونه از هر یک از رقت‌ها بر روی سه میکروارگانسیم کنترل: استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)^۱، اشیریشیا کولی (ATCC25922)^۲، سودومونا آئروژینوزا (ATCC27853)^۳ کشت داده می‌شدند. علاوه بر میکروارگانسیم‌های کنترل، میکروارگانسیم‌های جدا شده از مراجعات کلینیکی به بخش جراحی درمانگاه تخصصی دامپزشکی دانشگاه ارومیه، مورد ارزیابی حساسیت‌سنجی نسبت به عصاره آبکی سیر قرار گرفتند. این میکروارگانسیم‌ها شامل: استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کولی، سودومونا آئروژینوزا، کاندیدا آلبیکنس^۴، استرپتوکوک پیزون^۵، اسپریژیلوس نیگر^۶، پروتئوس میرابیلیس^۷، کلبسیلا پنومونیا^۸ نوع محیط کشت، درجه حرارت و طول مدت موردنیاز دوره انکوباسیون برای میکروارگانسیم‌های مورد آزمون مبنای توصیه‌های ATCC انجام گرفته است. محیط‌های کشت براساس دستورالعمل کارخانه سازنده آماده‌سازی گردیدند (Difco, Detroit, MI). از کشت ۲۴ ساعته هر میکروارگانسیم ۳ کلنی (۱۰۶ × ۱/۱ میکروارگانسیم در هر میلی‌لیتر معادل با لوله شماره ۳ کدورت‌سنجی براون (Browns' opacity) در ۴ میلی‌لیتر از آب مقطر محلول شده و بر محیط آگار مغز - قلب^۹ کشت داده می‌شدند. در ادامه ۵۰ میکرولیتر از هر رقت از نمونه آماده شده سیر از طریق دیسک‌های کاغذ صافی (به قطر ۵ میلی‌متر) بر روی محیط کشت قرار داده می‌شدند. عملیات مزبور در مورد

¹ *Staphylococcus aureus*

³ *Pseudomonas aeruginosa*

⁵ *Streptococcus pyogenes*

⁷ *Proteus mirabilis*

⁹ Brain-Hart agar

² *Escherichia coli*

⁴ *Candida albicans*

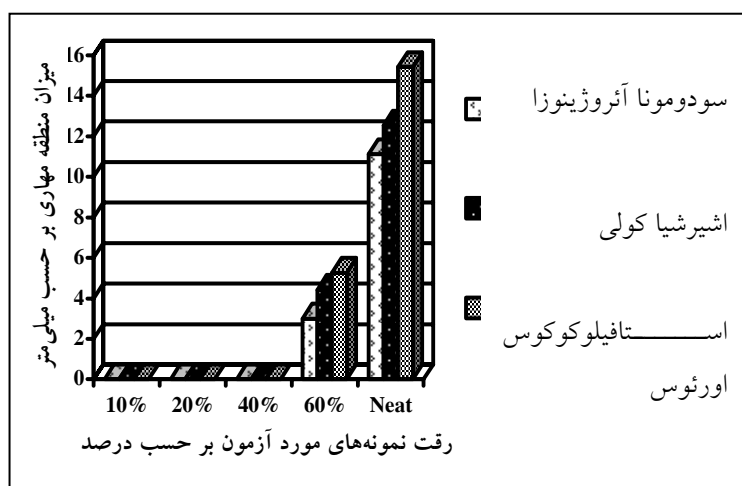
⁶ *Aspergillus niger*

⁸ *Klebsiella pneumonia*

¹ Minimal inhibition concentration

² One way analysis of variance (ANOVA)





نمودار شماره ۱- نمودار مقایسه‌ای مناطق مهارتی ایجاد شده توسط رقت‌های مختلف عصاره آبی سیر بر کشت میکروارگانیسم‌های کنترل

جدول شماره ۱- میزان مناطق مهارتی ایجاد شده توسط رقت‌های مختلف عصاره آبی سیر بر روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون

Inhibition zones (بر حسب میلی‌متر) میانگین مناطق مهارتی					میکروارگانیسم
خالص	۶۰ درصد	۴۰ درصد	۲۰ درصد	۱۰ درصد	
۱۱/۵۵	۳/۵۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
۱۳/۰۰	۵/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Escherichia coli</i>
۱۴/۳۰	۶/۵۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
۱۲/۰۰	۴/۲۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i>
۲۵/۴۶	۱۴/۸۰	۸/۵۷	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Streptococcus pyogenes</i>
۶/۲۴	۲/۹۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Aspergillus niger</i>
۵/۴۰	۲/۲۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Candida albicans</i>
۲۰/۲۲	۱۲/۷۴	۵/۵۰	۰/۰۰	۰/۰۰	<i>Klebsiella pneumonia</i>

آمینو اسید اکسیژنه به نام آلین^۱ حل شد این ماده به طور قابل ملاحظه‌ای در پیاز سالم سیر یافت می‌شود این ماده پایدار در اثر تاثیر آنزیم آلیناز^۲ به آلیسین^۳ تبدیل می‌شود. که فرم فعال مولکول آلین است. تبدیل فرم پایدار به فعال این مولکول پس از له شدن پیاز سیر در ظرف چند ثانیه صورت می‌گیرد. غلظت آنزیم مسؤول این فعل و انفعال (آلیناز) به طور غیرمعمولی در پیاز سالم سیر زیاد بوده در حدود ۱۰ درصد پروتئین‌های آنرا تشکیل می‌دهد [۲۳]. تاثیر ضدباکتریایی Allicin وسیع‌الطیف محسوب می‌شود. در بیشتر موارد ۵۰ درصد غلظت دوز کشنده^۴ بالاتر از مقدار

بوده‌اند [۲۰]. عصاره‌های سیر هم‌چنین بر ضدهلیکوباکتریپیلوری^۱ عامل اولسر معده هم موثر است [۲۱]. عصاره‌های سیر هم‌چنین قادرند که مانع تشکیل انتروتوکسین‌های A، B و C1 باکتری استافیلوکوکوس و هم‌چنین ترمونوکلناز شوند [۲۲]. Bailey و Cavalito نخستین بار نشان دادند که فعالیت ضدباکتریایی سیر عمدتاً مربوط به Allicin است. با وجود آن‌که آلیسین به طور قابل ملاحظه‌ای در سیر له شده وجود دارد ولی در پیاز سیر سالم یافت نمی‌شود. این معما در نهایت با کشف و استخراج یک

¹ Alliin
³ Allicin

² Allinase
⁴ 50% lethal dose concentrations

¹ *Helicobacter pylori*



(۱۹۸۷) و همکاران است [۷]. بررسی‌های اولیه بر روی موارد انسانی نشان‌دهنده آن‌است که ترکیب‌های به دست آمده از پودر سیر دارای تاثیرات مثبتی بر واکنش‌های سیستم ایمنی و فاگوسیتوز سلول‌های دفاعی است. در پژوهشی پس از تجویز ۶۰۰ میلی‌گرم پودر سیر در روز به مدت ۳ ماه، افزایش معنی‌داری در درصد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها روی داده و در آزمونی هم‌زمان توانایی فاگوسیتوز آن‌ها نسبت به باکتری *Escherichia coli* افزایش یافته بود [۲۰]. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر و گزارش‌های موجود در این زمینه می‌توان عصاره آبی سیر را ترکیبی قابل قبول در ممانعت از رشد باکتری‌ها خصوصاً عوامل پاتوژن جدا شده از موارد درمانگاهی دانست. البته پیش از آن‌که بتوان عصاره آبی سیر را در قالب یک داروی موضعی برای کاربردهای بالینی توصیه نمود نیاز به انجام ارزیابی‌های وسیع‌تری به ویژه پژوهش‌های بالینی و میدانی در این زمینه است. تا بتوان اطلاعات دقیق‌تری از جنبه‌های بالینی کاربرد آن به دست آورد.

موردنیاز برای برخی از آنتی‌بیوتیک‌های جدید است. شایان ذکر است که برخی سویه‌های مقاوم باکتری‌ها نظیر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و یا سویه‌های انتروتوکسیکوژنیک با مقاومت دارویی چندگانه اشتریشیا کولی، *Enterococcus Shigella*, *Shigella. Sonnei*, *Shigella. Flexneni dysenteriae*, به Allicin کاملاً حساس بوده‌اند [۲۴]. حساسیت باکتری‌های مختلف و میکروارگانیسم‌های جدا شده از موارد درمانگاهی به ترکیب‌های خالص Allicin کاملاً معنی‌دار بوده است [۲۴]. براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق *Streptococcus pyogenes* حساس‌ترین باکتری نسبت به تاثیر مهاری عصاره آبی سیر بوده است و در مقابل کمترین حساسیت را *Pseudomonas aeruginosa* از خود نشان داده است ($p < 0.05$). یافته‌های مذکور با گزارش Koch (۱۹۹۶) و همکاران در مورد حساسیت باکتری‌ها به تاثیر مهاری عصاره سیر مطابقت دارد [۱۴]. البته لازم به ذکر است که میکروارگانیسم‌های قارچی مورد آزمون حساسیت کمتری از میکروارگانیسم‌های باکتری از خود نشان دادند. نتایج اخیر در مغایرت با یافته‌های Graham

منابع

1. Zaika LL. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food. Safe.* 1988; 9: 97 – 118.
2. Baghalian K, Ziaib SA, Naghavi MR, Naghdi Badib H, Khalighia A. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Sci. Hort.* 2005; 103: 155 – 66.
3. Haciseferogullari H, Ozcan M, Demir F, Calisir S. Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). *J. Food Eng.* 2005; 68: 463 – 9.
4. Avecina: Law in medicine. Translated by Sharafkandi. A. Islamic Guidance Ministry press. Tehran. 1991, 2nd Volume, pp: 225- 6.
5. Parry JW. Spices; their morphology, histological and chemistry. *Chemical Publishing Co.* New York. 1962; pp: 226 – 7.
6. Carson JF. Chemistry and biological properties of onions and garlic. *Food. Rev. Int.* 1987; 3: 100 – 3.
7. Graham HD, Graham EJF. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and toxin production by garlic. *J. Food Safe.* 1987; 8: 101 – 8.
8. Akgul A. Spice science and technology. Turkish Association of Food Technologists Publ. Ankara. 1993, pp: 451 – 2.
9. Baruchin AM, Sagi A, Yoffe B, Ronen M. Garlic burns. *Burns.* 2001; 27: 781 – 2.



10. Sharma GP, Prasad S. Drying of garlic (*Allium sativum* L.) cloves by microwave-hot air combination. *J. Food Eng.* 2001; 50: 99 – 105.
11. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.* 1985; 252: 114 – 9.
12. Sivam GP. Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *J. Nut.* 2001; 131: 1106 – 8.
13. Darbyshire B and Henry RJ. Differences in fructan content and synthesis in some *Allium* species. *New Phytol.* 1981; 87: 249 - 56.
14. Koch HP and Lawson LD. Garlic, the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species, in: Retford D.C. Ed, Williams and Wilkins, Baltimore. 1996, pp: 1 - 233.
15. Lawson LD. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In H. P. Koch and L. D. Lawson (ed.). *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 1996, p: 38 – 9.
16. Reuter HD, Koch HP, Lawson LD. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. In H. P. Koch and L. D. Lawson (ed.). *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*. Williams and Wilkins, Baltimore, Md., 1996.; pp: 135 – 213.
17. Ankri, SD. Mirelman, Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 1999; 1: 125 –9.
18. Cooper AJL and Pinto JT. Aminotransferase, L - amino acid oxidase and b-lyase reactions involving L-cysteine S-conjugates found in *Allium* extracts. Relevance to biological activity. *Bioch. Pharm.* 2005; 69: 209 – 20.
19. Shukla Y and Taneja P. Antimutagenic effects of garlic extract on chromosomal aberrations. *Cancer lett.* 2002; 31: 31 - 6.
20. Uchida Y, Takahashi T, Sato N. The characteristics of the antibacterial activity of garlic. *Jpn. J. Antibiotics.* 1975; 28: 638 - 42.
21. Celiini L, Di Campli B, Masulli M, Di Bartolomeo S, Aliocati N. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS. Immenol. Med. Micrbiol.* 1996; 13: 273 – 7.
22. Gonzalez-Fandos F, Garcia-Lopez Mi, Sierra Mi, Otero A. Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and thermonuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic. *J. Appl. Bacteriol.* 1994; 77: 549 - 52.
23. Cavallito C, Bailey JH. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 1944; 66: 1944 - 52.
24. Holzgartner H, Schmidt U, Kuhn U. Congress of medical plant. *Abstract, Eur. Jnl. Clin. Re. s* 1992; 3, pp: 8 - 9.

