بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و کلروفرمی گیاه Allium Sativum بر باکتری اشریشیاکلی

سکینه مرادخانی[۱]، نادر حاجی زاده[۲]، حامد ملاعباس زاده[۳*]

۱.استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور
۲.کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایلخچی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
۳.کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند

* نشانی برای مکاتبه: دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند Hamed_molaabaszadeh@yahoo.com
دریافت مقاله: فروردین نود و سه پذیرش برای چاپ: خرداد نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *باکتری اشریشاکلی یکی از مهم ترین عوامل عفونت زا برای انسان به شمار می آید و از طرفی با افزایش مقاومت باکتری ها نسبت به داروهای شیمیایی و عوارض جانبی کم گیاهان دارویی، امروزه گیاهان دارویی بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته اند. هدف از این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی عصاره آبی و کلروفرمی گیاه Allium Sativum بر باکتری اشریشیاکلی می باشد.*

مواد و روش ها: *در این مطالعه تجربی ابتدا عصاره آبی و کلروفرمی گیاه Allium Sativum تهیه شد، سپس میزان MIC و MBC عصاره ها محاسبه و قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیاکلی در رقت های مختلف عصاره ها اندازه گیری شد و تست حساسیت آنتی بیوتیک های مختلف با روش استاندارد کربی- بائر بررسی و نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و آزمون آماری One-Way ANOVA تجزیه و تحلیل شد.*

یافته ها: *عصاره کلروفرمی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳±۲۷، اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به عصاره آبی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲±۹ نشان داد و بیش ترین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آمیکاسین با ۴۰/۶۹ درصد مشاهده شد.*

نتیجه گیری: *اگر چه کاربرد بالینی عصاره ها و اسانس های گیاهی به دلیل عوارض جانبی کمتر نسبت به عوامل درمانی رایج، با ارزش به نظر می رسد، اما جهت کاربرد بالینی ضد میکروبی عصاره آبی و کلروفرمی گیاه Allium Sativum باید تحقیقات بیش تری در زمینه مکانیسم عمل ترکیبات موثر این گیاه بر روی عوامل میکروبی انجام شود.*

واژگان کلیدی: *اشریشاکلی، سیر، عصاره آبی، عصاره کلروفرمی، مقاومت دارویی*

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها، قرن ها سابقه دارد. امروزه با اینکه بخش عظیمی از داروهای مصرفی شیمیایی هستند اما تخمین زده شده است که دست کم، یک سوم کلیه فرآورده های دارویی منشا گیاهی دارند(۱). از اوایل قرن بیستم با پیش رفت علم شیمی و کشف سیستم های پیچیده سنتز آلی منجر به توسعه صنعت داروسازی و جای گزینی داروهای مصنوعی به جای داروهای گیاهی شد. اما هم زمان با پیش رفت در تولید داروهای جدید و آنتی بیوتیک های مختلف، به تدریج اثرات مضر این داروها ظاهر شدند و از دهه ۱۹۵۰ باکتری های بیماری زای متعددی به آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند که این مقاومت هم چنان در حال گسترش است(۲). استفاده از گیاهان دارویی به خاطر داشتن عوارض و هزینه های کم تر و سازگاری بیش تر بیماران به این داروها در دهه های اخیر مورد توجه بیش تری قرار گرفته است(۳). در کشورهای در حال توسعه که طب سنتی نقش مهمی در حفظ سلامت مردم دارد گیاهان منبع عمده تامین داروها به شمار می آیند(۴).

سیر یا Garlic با نام علمی Allium sativum گیاهی است متعلق به خانواده آلیاسه (Alliaceae) که بومی آسیای میانه است و امروزه درتمام نقاط دنیا یافت می شود. گونه های مختلف این گیاه از قرن ها قبل به عنوان ادویه، چاشنی غذایی و نیز به عنوان دارو در طب گیاهی در درمان انواع مختلف بیماری ها استفاده می شده است(۵). سیر از خواص آنتی بیوتیکی، ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، کاهنده قند خون و محافظت کنندگی از سیستم قلبی-عروقی برخوردار است، اثرات ضد باکتریایی سیر بر باکتری های متفاوتی نیز بررسی و گزارش شده است(۸-۶).

باکتری اشریشیاکلی یکی از شایع ترین عوامل باکتریای است که از عفونت های انسانی جدا شده و باعث ایجاد عفونت های دستگاه ادراری، گوارشی و مننژیت در نوزادان می شود. این باکتری یکی از بیماری زا های فرصت طلب بیمارستانی نیز به شمار می آید. هم چنین جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوان محسوب شده، در آب و خاک نیز یافت می شود(۹و۱۰). باکتری اشریشیاکلی جزء خانواده انتروباکتریاسه می باشد که در روده انسان و حیوانات زندگی می کند و وجود آن در آب و مواد غذایی دلیل بر آلودگی آنها از راه مدفوع می باشد، این باکتری گرم منفی، فاقد اسپور و برخی دارای کپسول یا میکروکپسول هستند(۱۱). در سال های اخیر باکتری اشریشیاکلی افزایش مقاومت نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها را نشان داده است، گونه های مقاوم اشرشیاکلی روز به روز بیش تر شده و مشکلات از جایی شروع می شود که بیماران دوره درمان را کامل نکرده، باکتری های زنده شروع به مقاومت می نمایند که معضلی برای پزشکان محسوب می گردد(۱۲).

توجه به مطالب فوق و اثرات ضد باکتریایی گیاه Allium Sativum و وفور کشت و مصرف آن در کشورمان چه به صورت خام و چه به صورت فرآوری شده، انجام مطالعات تکمیلی در این زمینه می تواند استفاده گسترده تر و هدف مندتر آن را در پی داشته باشد، لذا این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد میکروبی عصاره آبی و کلروفرمی گیاه Allium Sativum بر باکتری اشریشیاکلی انجام شد.

روش کار

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه پیام نور واحد خوی انجام گرفت. نمونه های اشرشیاکلی پس از جمع آوری از آزمایشگاه های سطح شهر خوی و پس از کشت بر روی محیط EMB آگار (Merck, Homburg, Germany) و انجام تست های بیوشیمیایی افتراقی نظیر TSI، اوره آز، سیمون سیترات، MR/VP، SIM، لیزین دکربوکسیلاز آگار و با استفاده از جداول استاندارد، ایزوله های اشریشیاکلی جدا وشناسایی شدند. ارزیابی حساسیت ضد میکروبی سویه های جدا شده، با روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Kirby-bauer) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Homburg, Germany)، با استفاده از دیسک های آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، کو آموکسی کلاو (۳۰ میکروگرم) و آموکسی سیلین (۲۵ میکروگرم) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان انجام گرفت(۱۳). برای این کار محیط مولر هینتون آگار و سوسپانسیون میکروبی (کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند) تهیه و توسط سوآپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگارکشت داده شد و بعد دیسک ها با فاصله لازم در کنار هم قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ °C، قطر هاله های رشد یافته شده توسط خط کش (Antiobiotic Zone Scale ruler) اندازه گرفته شد، سپس با کمک جدول استاندارد موجود نتایج برای هر آنتی بیوتیک مطابق با دستورالعمل مربوطه به عنوان حساس (S)، حدواسط (I) و مقاوم (R) ثبت شد. از سویه های استاندارد، اشریشیاکلی ATCC 35218 به عنوان کنترل کیفی استفاده گردید.

برای تهیه عصاره آبی سیر از روش Bakri و Douglas استفاده شد، ابتدا ۸۰ گرم سیر پس از توزین و شست و شو و جداساختن پوسته خارجی آن، له شده و توسط آسیاب برقی، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل کاملاً مخلوط و هموژنیزه گردید. این مخلوط ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد و پس از برداشتن مایع رویی از فیلتر واتمن شماره یک عبور داده شد و پس از عبور از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرونی، استریل گردید و با کم کردن وزن مواد غیر محلول از وزن حبه های سیر اولیه، غلظت نهایی سیر در عصاره، ۵۱۲ mg/ml محاسبه شد(۱۴).

تهیه عصاره کلروفرمی سیر حاوی آلیسین مطابق منابع انجام شد که به طور خلاصه شامل خرد کردن سیر به هم راه آب مقطر در مخلوط کن، صاف کردن و سپس افزودن کلروفرم به عصاره آبی در دکانتور، جدا کردن فاز پایینی (فاز کلروفرمی) و قرار دادن آن در دستگاه تقطیر در خلا در دمای ۴۵-۵۵°C برای خالص سازی عصاره و تقطیر کلروفرم بود. سپس عصاره تهیه شده را ۱۸-۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۰°C برای حذف بقیه کلروفرم قرار دادیم تا در نهایت یک عصاره زرد تا سبز رنگ غلیظ با بوی تند سیر بدست آمد(۱۵).

برای بررسی اثر عصاره ها باکتری های اشریشیاکلی کشت شده در محیط کشت مایع، به پلیت های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار انتقال داده شدند. سپس دیسک های آغشته به رقت های خالص، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ و ۱/۶۴ بر روی محیط کشت حاوی باکتری اشریشیاکلی قرار داده شدند، این آزمایش یک بار برای عصاره آبی و یک بار برای عصاره کلروفرمی انجام شد. پس از انکوبه کردن قطر هاله های عدم رشد باکتری اندازه گیری شدند. جهت جلوگیری از احتمال وقوع خطا در مراحل کار، آزمایش ها سه بار تکرار شدند. میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد Minimum Inhibitory Concentration (MIC) و حداقل غلظت کشنده Minimum Bactericidal Concentration (MBC) با روش رقت در براث تعیین شد. ابتدا از عصاره های تهیه شده مجموعه سریال رقتی، با رقت های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶و۱:۳۲ در لوله های حاوی ۱ میلی لیتر محیط مولر هینتون براث تهیه و سپس برای هر یک از باکتری های مورد آزمایش یک سری از سریال های رقتی تهیه شده، به کار برده شد. به هر کدام از رقت ها به ازای هر میلی لیتر محیط مایع درون لوله ۵×۱۰^{۵} باکتری فعال اضافه گردید. در کنار هر سریال رقتی از کنترل مثبت (محیط کشت + باکتری + ۱درصد حلال بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت فاقد باکتری) استفاده گردید. نمونه های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای۳۷ °C انکوبه شدند. از تمام لوله های فاقد کدورت به میزان ۰/۵میلی لیتر بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و آخرین رقتی از عصاره ها که قادر به کشتن ۹۹/۹٪ از باکتری های زنده اولیه بود، به عنوان غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته شد(۱۶).

نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸و آزمون آماری One-Way ANOVA تجزیه و تحلیل شد و مرز معنی داری روی $P<۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته ها

از میان ۱۳۲ سویه مورد آزمایش ۸۶ سویه اشریشیاکلی جدا گردید. بیش ترین سویه اشریشیاکلی جدا شده مربوط به نمونه های ادراری و کم ترین سویه اشریشیاکلی جدا شده مربوط به نمونه های واژن بودند (جدول ۱).

جدول شماره ۱. فراوانی سویه های اشریشیاکلی به تفکیک نمونه های بالینی

تعداد و درصد نمونه های بالینی جدا شده

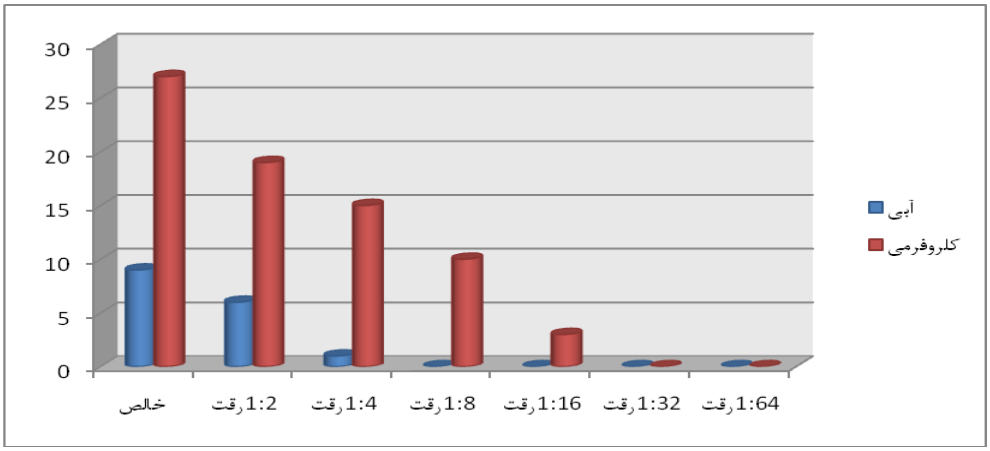
خون	زخم	ادرار	آبسه	واژن	خلط	سوند
۹ (۱۰/۴۶)	۷ (۸/۱۴)	۵۱ (۵۹/۳۱)	۲ (۲/۳۳)	۰ (۰)	۶ (۶/۹۷)	۱۱ (۱۲/۷۹)

بیش ترین میزان حساسیت نسبت به آمیکاسین با ۴۰/۶۹٪ و بیشترین میزان مقاومت نسبت به آموکسی سیلین با ۹۱/۸۶٪ بود(جدول ۲).

جدول شماره ۲. نتایج تست آنتی بیوگرام سویه های اشریشیاکلی

آنتی بیوتیک	حساس	بینابینی	مقاوم
	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد	(درصد) تعداد
آمیکاسین	۳۵ (۴۰/۶۹)	۲ (۲/۳۳)	۴۹ (۵۶/۹۸)
سفتریاکسون	۳۱ (۳۶/۰۴)	۳ (۳/۴۹)	۵۲ (۶۰/۴۷)
آمپی سیلین	۹ (۱۰/۴۶)	۲ (۲/۳۳)	۷۵ (۸۷/۲۱)
آموکسی سیلین	۶ (۶/۹۷)	۱ (۱/۱۷)	۷۹ (۹۱/۸۶)
کو آموکسی کلاو	۱۴ (۱۶/۲۸)	۳ (۳/۴۹)	۶۹(۸۰/۲۳)

در میان عصاره های تهیه شده از سیر، عصاره کلروفرمی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳±۲۷، اثر ضد میکروبی قوی تری بر روی باکتری اشریشیاکلی نشان داد. اما عصاره آبی اثر ضد میکروبی ضعیف تری(۲±۹) بر روی باکتری اشریشیاکلی داشت(نمودار۱). با رقیق تر کردن عصاره تهیه شده، اثر ضد میکروبی کاهش یافت به طوری که در رقت ۱:۴ عصاره کلروفرمی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱±۱۵و عصاره آبی با میانگین قطر هاله عدم رشد تقریباً صفر بدست آمد. در رقت های ۱:۳۲و۱:۶۴ هیچ گونه حساسیت باکتریایی مشاهده نشد. MIC و MBC بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، برای هر دو عصاره به ترتیب ۱۲۰ و ۸۴۰ بدست آمد.



نمودار شماره۱. میانگین ± انحراف معیار قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیاکلی برحسب میلی متر

بحث

طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی،۸۰٪ از جمعیت کشورهای توسعه یافته، کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی نیز استفاده می نمایند. در این میان ایجاد مقاومت میکروبی روز افزون نسبت به آنتی بیوتیک های موجود سبب گشته که در جهت یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید، گیاهان نیز مورد بررسی قرار گیرند(۱۷). چندین گیاه دارویی وجود دارند که در طب سنتی از آن ها برای درمان عفونت ها استفاده شده است(۱۸). در طی مطالعات انجام شده بر روی سیر، این میوه را منبع خوب، ارزان و طبیعی آنتی اکسیدان هایی نظیر اسیدهای فنولی و فلاونوئیدها معرفی نموده اند(۱۹).

عمل کرد ضد باکتریایی سیر را عمدتا به آلیسین موجود در آن نسبت داده اند و اثرات ضد میکروبی آلیسین خالص در چندین بررسی، گزارش شده است. آلیسین، به مقدار زیاد در سیر له شده وجود دارد و به واسطه اثر آلیناز بر آمینو اسید اکسیژنه آلین (Allin) موجود در سیر سالم و له نشده به وجود می آید. این آنزیم، در سیر له نشده به مقدار زیاد وجود داشته و حدود ۱۰ درصد پروتئین های موجود در سیر را تشکیل می دهد.

مکانیزم عمل ضد باکتریایی آلیسین مشخص نیست ولی پاره ای از بررسی ها حاکی از خاصیت تغییر دهندگی آن بر گروه های سولفیدریل و مهار آنزیم های حاوی این گروه ها می باشد، عصاره سیر در دمای معمولی از فعالیت باکتری اشرشیاکولای و سالمونلا، باکتری های گرم مثبت از قبیل آنتراسیس تیپ B و استرپتوکوکوس تیپ A ممانعت به عمل می آورد و اثرات باکتریسیدی سیر، قوی تر از پنی سیلین می باشد. به طوری که 1mg آلیسین برابر ۱۵ واحد استاندارد پنی سیلین تأثیر دارد. در مطالعه ای اثرات آنتی باکتریال وسیع الطیف سیر روی انواع باکتری های گرم منفی و گرم مثبت تأیید گردید(۲۰). Iwalokun و هم کاران تاثیر عصاره آبی سیر بر روی باکتری های استرپتوکوکوس پنومونیه، پسودوموناس ائروژینوزا، اشریشیاکلی و شیگلا(۲۱)، Lemar و هم کاران اثر عصاره سیر بر روی کاندیدیا(۲۲)، Fani و هم کاران تاثیر سیر بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس(۲۳)، علیپوریگانه و هم کاران عصاره حاصل از پودر سیر بر باکتری سالمونلا و شیگلا(۲۴)، کاظمی زاده و هم کاران تاثیر عصاره آبی سیر بر روی باکتری انتروکوکوس فکالیس(۲۵)، ساویوم و هم کاران تاثیر عصاره کلروفرمی سیر بر روی باکتری هلیکوباکتری پیلوری(۲۶)، دلاها و هم کاران تاثیر عصاره کلروفرمی سیر بر روی باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس(۱۵) و دشپاند و هم کاران تاثیر عصاره کلروفرمی سیر بر روی باکتری مایکوباکتریوم آویوم(۲۷) را می توان نام برد. این مطالعات نشان می دهد که طیف اثرات ضد باکتریایی گیاه سیر وسیع می باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش با کاهش غلظت و افزایش رقت عصاره های آبی و کلروفرمی، اثر ضدمیکروبی کاهش می یابد و در رقت های ۱:۳۲و۱:۶۴ علیه اشریشیاکلی اثر ضدمیکروبی با عصاره آبی و کلروفرمی مشاهده نگردید این یافته ها با نتایج حاصل از تحقیق تاجیک و هم کاران (۱۳۸۷) که تاثیر عصاره آبی سیر را برروی میکروارگانیسم های بیماری زا، بررسی کردند، مطابقت دارد(۲۸). در این مطالعه نشان داده شد که عصاره کلروفرمی دارای اثر ضد میکروبی قوی تری نسبت به عصاره آبی بود که با پژوهش نظام آبادی و همکاران(۱۳۹۰)، مطابقت دارد(۲۹).

نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام در این مطالعه نشان داد که میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین ۸۷/۲۱ درصد می باشد، این نتایج با مطالعات ملازاده و هم کاران که بر روی سویه های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های ادراری زنان باردار در شهر خوی و سلماس استان آذربایجان غربی که ۸۰/۹۳ درصد در شهر خوی و ۸۷/۰۶ درصد در شهر سلماس گزارش شده بود مطابقت داشت(۳۰). در مطالعه ای که ملاعباس زاده و هم کاران بر روی سویه های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان آراد تهران انجام دادند میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آمیکاسین و سفتریاکسون را به ترتیب ۴۶/۹ درصد و ۶۰/۷ درصد اعلام کردند که با نتایج حاصل از این بررسی که به ترتیب ۵۶/۹۸ درصد و ۶۰/۴۷ درصد مشاهده شد مطابقت دارد(۳۱). عبدالهی خیرآبادی و هم کاران مطالعه ای بر روی سویه های اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان ولی عصر شهرستان فسا انجام دادند و میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آموکسی سیلین را ۸۰/۸ درصد بیان کردند که با نتایج حاصل از این بررسی که ۹۱/۸۶ درصد مشاهده شد مطابقت ندارد. با توجه به اختلاف مناطق جغرافیائی سویه های اخذ شده اختلاف نتایج بدست آمده قابل توجیه می باشد(۳۲). مهاجری و هم کاران مطالعه ای بر روی سویه های اشریشیاکلی در شهر کرمانشاه انجام دادند و میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک کوآموکسی کلاو را ۷۸ درصد بیان کردند که با نتایج حاصل از این بررسی که ۸۰/۲۳ درصد مشاهده شد مطابقت دارد(۳۳). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تاثیر عصاره کلروفرمی گیاه سیر بر روی سویه های اشریشیاکلی می تواند حائز اهمیت باشد، به هر حال کاربرد بالینی بیشتر این گیاه نیازمند مطالعات بیش تر و وسیع تر است.

نتیجه گیری

به نظر می رسد استفاده از ترکیبات دارای عصاره سیر برای جلوگیری از آلودگی های مختلف میکروبی و بیماری های ناشی از آنها مفید خواهد بود، لذا پیشنهاد می شود با بررسی دقیق و مطالعات گسترده تر در مراکز تحقیقاتی بر روی نمونه های مختلف باکتری های تهیه شده از سراسر کشور بتوان گام های اساسی در جهت معرفی بیشتر گیاه سیر به عنوان یک عامل ضد میکروبی بر داشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و مسئولین و کارکنان آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه پیام نور واحد خوی که با فراهم نمودن امکانات و وسایل و تجهیزات لازم نویسندگان این مقاله را یاری نمودند؛ نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Eisenberg DM, Davis RB, Ernst SL, Apple S, Wilkey S, Van Rompay M, et al. Trends in alternative medicine use in the U.S.A. 1990-1997, Results of a foollow-up national survey. JAMA. 1998; 280(18): 1569 - 75.

2. Neu HC. The crisis of antibiotic resistance. J Science. 1992; 257(5073): 1061-9.

3. Soltanipoor MA. Comparision the components of essential oils of Majadae Zhumeria obtain from Hormozgan province and study on aleopatic potential and antimicrobial effects of extracted essential oils. MS thessis, School of Science, Shiraz University. 2002, pp: 23 - 9.

4. Hayashi H, Hattori S, Inoue K, Khodzhimatov O, Ashurmetov O, Ito M, et al. Field survey of Glycchiza plants in central asia (3). Chemical characterization of G. glabra collected in Uzbekistan. J Chem Pharm Bull. 2003; 51(11): 1338-40.

5. Haciseferogullari H, Ozcan M, Demir F, Calisir S. Some nutritional and technological properties of garlic (Allium sativum L). J Food Eng. 2005; 68(4): 463-9.

6. Auger J, Arnault I, Diwo-Allain S, Ravier M, Molia F, Magali P. Insecticidal and fungicidal potential of Allium substances as biofumigants. J Agroindustria. 2004; 3(3): 5-8.

7. Sivam GP. Protection against Helicobacter pylori and other bacterial infections by garlic. J Nutr 2001; 131(3): 1106-8.

8. Hosseini-Jazani N, Shahabi S, Abdi-Ali A, Zarrin S, Nasim A. In vitro antibacterial activity of garlic against isolates of Acinetobacter spp. J Biol Sci. 2007; 7(5): 819-22.

9. Sanchez UM, Bello TH, Dominguez YM, Mella MS, Zemelman ZR, Gonzalez RG. Transference of extended spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of Klebsiella pneumoniae to other species of Enterobacteriaceae. J Rev Med Chil. 2006; 134(4): 415-20.

10. Akinfogunla OJ, Eghafona NO, Ekoi OH. Diarrheag Escherichia coli (DEC): prevalence among in and ambulatory patients and susceptibility to antimicrobial chemotherapeutic agents. J Bac Research. 2009; 1(3): 34-8.

11. Kenneth J, Ryan MD, Cray MD. Sherries Medical Microbiology. 4th Mc Graw Hill, pp 354-7.

12. Von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications. Int J Med Microbiol. 2005; 295(6-7): 503-11.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement, M100-17. Wayne: CLSI, 2007.

14. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. J Arch Oral Biol. 2005; 50(7): 645-51.

15. Delaha EC, Garagusi VF. Inhibition of mycobacteria by garlic extract (Allium sativum). J Antimicrob Agents Chemother. 1985; 27(4): 485-6.

16. Izadi Z, Esnaashari M, Ahmadvand Gh, Davoodi P, Piri Kh. Evaluation of Chemical compound and antibacterial effects of Mint Essence. J Armagane Danesh. 2009; 55(14): 45-52. (Full Text in Persian)

17. Moshafi MH, Mehrabani M, Zolhasab H. Antibacterial Activity Studies of Salvia Mirzayanii and Salvia Atropatana against Six Standard Gram Positive and Gram Negative Bacteria. J KMUS, 2012; 19(6): 511-9. (Full Text in Persian)

18. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. J Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564-82.

19. Baghalian K, Ziaib SA, Naghavic MR, Naghdi Badi HN, Khalighia A. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (Allium sativum L.) ecotypes. J Scientia Horticulturae. 2005;103(2): 155-66.

20. Harris J C, Cottrell S L, Plummer s, Lioy D. Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic). J Appl Microbiol Biotechnol. 2001;57(3): 282-6.

21. Iwalokun BA, Ogunledun A, Ogbolu DO, Bamiro SB, Jimi-Omojola J. In vitro antimicrobial properties of garlic extract against multidrug-resistant bacteria and Candida species from Nigeria. J Med Food. 2004; 7(3): 327-33.

22. Lemar KM, Turner MP, Lioyd D. Garlic (Allium sativum) as an anti- Candida agent: A comparision of the efficacy of fresh garlic and freeze – dried extracts. J Appl Microbiol. 2002; 93(3): 398-405.
23. Fani M, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (Allium sativum) extract on multidrug-resistant Streptococcus mutans. J Indian Soc Pedod Prevent Dent. 2007; 25(4): 164-8.

24. Aliporyegane M, Tajik H, Zadehashem E. Inhibitory effect of garlic extract on the growth of Salmonella typhimurium and Shigella dysenteric. J Knowledge Health. 2008; 4(2): 6-9.

25. Kazemizadeh Z, Tashakori M, Rezaeian M. Comparison of antibacterial effects of garlic extract with two intracanal irrigants on Enterococcus faecalis. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2011; 10(1): 3-13. (Full Text in Persian)

26. Sivam GP, Lampe JW, Ulness B, Swanzy SR, Potter JD. Helicobacter pylori in vitro suscep tibity to garlic (Allium sativum) extract. J Nutr Cancer. 1997; 27(2): 118-21.

27. Deshpande RG, Khan MB, Bhat DA, Navalkar RG. Inhibition of Mycobacterium avium complex isolates from AIDS patients by garlic (Allium sativum). J Antimicrob Chemother. 1993; 32(4): 623-6.

28. Tajik H, Shokuhi Sabet Jalali F. In vitro Assessment of Antimicrobial Efficacy of Aqueous Extract of Garlic Against Wound-infecting Microorganisms. JMP. 2008; (2)26: 10-5. (Full Text in Persian)

29. Nezamabadi M, Soltani F, Zeinali H, Azizi A, Mohseni J, Mohajerani MH. Evaluation of antimicrobial effects of hydroalcholic and aquatic extracts of sumac, on gram negative bacteria E.coli. The First International & 4th National Congress on health Education & Promotion. 2011. Tabriz. (Full Text in Persian)

30. Mollazadeh M, Mollaabbaszadeh H, Mohammadzadeh Gheshlaghi N. Survey of Sensibility and Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Strains Isolated from pregnant women urine in Khoy and Salmas City in West Azerbayjan. J Zist fan Microbiol. 2011; 4(12): 13-20. (Full Text in Persian)

31. Molaabaszadeh H, Eslami K, Hamidi M, Asadollahi M. Examination of sensitivity and resistance against antibiotics in derivations of E.coli bacteria extracted from clinical samples of Tehran's Araad Hospital between (2007-2010). Iranian J Infec Dise. 2013; 18(60): 59-63. (Full Text in Persian)

32. Abdollahi Kheirabadi S, Najafipour S, Kafilzadeh F, Abdollahi A, Jafari S, Moravej A. Evaluation of Drug Resistance Pattern of Escherichia coli Strains Isolated from Fasa Vali-e-Asr Hospital Patients. J Fasa Univ Med Sci. 2012; 2(4): 273-8. (Full Text in Persian)

33. Mohajeri P, Izadi B, Naghshi N. Antibiotic sensitivity of Escherichia coli isolated from urinary tract infection referred to Kermanshah central laboratory. J Kermanshah Univ Med Sci. 2011; 15(1): 51-6. (Full Text in Persian)