

اثرات ضد باکتریایی عصاره آبی سیر بر روی باکتری های شایع عامل اسهال در شرایط آزمایشگاهی

رحیم قدیمی پور^{۱*}، سعید صدیق اعتقاد^۲، رقیه چلنگر^۴، مهدی علیپور یگانه^۵،
بابک حدیری^۶، غلامرضا افکاری^۶

^۱ بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، اهواز، ایران
^۲ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
^۳ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیولوژی خاک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات اهواز، اهواز، ایران
^۵ دانش آموخته دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۶ دانش آموخته دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول: بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، اهواز، ایران.
پست الکترونیک: Ghadimipoorrahim@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سیر با نام علمی *Allium sativum* دارای اثرات ضد میکروبی طبیعی بوده و برای مقابله با عوامل عفونت زا استفاده می شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر غلظت های مختلف عصاره آبی پودر سیر (AEGP)^۱ و عصاره آبی قرص سیر (AEGT)^۲ بر روی سه باکتری سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتریه و اشرشیا کولی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) می باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه، عصاره های آبی سیر بر اساس روش Bakri و Douglas تهیه گردیدند. همچنین برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) این عصاره ها از روش استاندارد لوله ای (Standard Tube Test) استفاده شد.

یافته ها: MIC دو عصاره AEGP و AEGT بر روی سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتریه و اشرشیا کولی به ترتیب ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵mg/ml و ۴۰، ۴۰، ۲۰mg/ml بدست آمد. MBC این عصاره ها بر روی سه باکتری مورد مطالعه به ترتیب ۲۵، ۲۵، ۱۲/۵mg/ml و ۸۰، ۸۰، ۴۰mg/ml بود. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، در شرایط آزمایشگاهی اثر ممانعت کنندگی و فعالیت باکتری کشی AEGP بر روی هر سه باکتری تحت آزمایش بطور معنی داری بیشتر از AEGT می باشد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی سیر (AEG) بخصوص عصاره آبی حاصل از پودر سیر تازه، در شرایط آزمایشگاهی دارای اثرات ضد میکروبی قابل توجهی بر روی میکروارگانیسم های تحت آزمایش عامل اسهال بوده و پیشنهاد می شود جهت بررسی اثرات این عصاره در شرایط درون تنی (in vivo) و انجام ارزیابی های بالینی، مطالعات بیشتری صورت پذیرد.

واژه های کلیدی: عصاره آبی سیر (AEG)، آلیسین، باکتری های شایع عامل اسهال، حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC)، حداقل غلظت باکتری کشی (MBC).

- 1- Aqueous Extract of Garlic Powder (AEGP)
- 2- Aqueous Extract of Garlic Tablet (AEGT)

مقدمه

در سال های اخیر برای کنترل بیماری های عفونی از داروهای ضد میکروبی که بصورت تجاری در دسترس می باشند، استفاده می شود. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها منجر به گسترش مقاومت دارویی چندگانه (MDR) در اغلب پاتوژن های باکتریایی گردیده است. افزایش مقاومت دارویی به عنوان مهمترین مانع درمان موفق بیماری های عفونی و کنترل پاتوژنیسته عوامل میکروبی به شمار می رود [۱]. گسترش مقاومت دارویی در عوامل بیماریزای باکتریایی از یکسو و افزایش تمایل مصرف کنندگان به غذاهای سالم و بی خطر از سوی دیگر، منجر به ابداع عوامل ضد میکروبی جدید و طبیعی گردیده است [۲-۴].

سیر با نام علمی *Allium Sativum*، گیاهی متعلق به خانواده لیلیاسه بوده و بومی آسیای مرکزی می باشد هر چند این گیاه امروزه در تمام نقاط دنیا یافت می شود. در طول قرن های متمادی، گونه های مختلف سیر به عنوان چاشنی یا ادویه جهت خوش طعم نمودن غذاها مورد استفاده قرار گرفته اند [۵]. در طب گیاهی، سیر به عنوان یک مکمل طبیعی برای درمان انواع بیماری ها و اختلالات از قبیل فشار خون بالا، آرایمر، ترومبوز، تب یونجه، آسم، عفونت گوش کودکان و حتی سرطان مطرح بوده است. تحقیقات نشان می دهند این گیاه برای تنظیم کلسترول خون، قند خون و محافظت از سیستم قلبی-عروقی مفید بوده و سیستم ایمنی را برای مبارزه با بیماری های مختلف تقویت می نماید. همچنین سیر دارای خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی می باشد [۶-۱۳]. سیر به عنوان یک عامل ضد باکتریایی قوی شناسایی شده و خاصیت ممانعت کنندگی آن هم بر روی باکتری های گرم منفی (اشرشیا، گونه های پروتئوس، سالمونلا، سراشیا، سیتروباکتر، انتروباکتر، پورفیروموناس جینجیوالیس، سودوموناس، کلبسیلا و هلیکوباکتر پیلوری) و هم بر علیه باکتری های گرم مثبت (استافیلوکوکوس آرنوس، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس سانگوئیس، استرپتوکوک های گروه A و باسیلوس آنتراسیس) به

اثبات رسیده است [۱۴-۱۷]. بر اساس یافته های شوبانا^۱ و همکاران [۱۸]، عصاره سیر از رشد عوامل بیماریزای روده ای مانند اشرشیا کولی، پروتئوس میرابلیس، سالمونلا تیفی و شیگلا فلکسنری ممانعت می نماید. همچنین صادقیان و قزوینی [۱۹] مشاهده کردند که همه جدایه های تحت آزمایش شیگلا حساس به عصاره های سیر بوده و هیچ کدام از آن ها مقاومتی را در مقابل این عصاره ها از خود نشان ندادند.

اصلی ترین ماده ضد میکروبی موجود در سیر، ترکیب ارگانوسولفور به نام تیو ۲- پروپن ۱- سولفینیک اسید S- آلیل استر می باشد که آلیسین (Allicin) نامیده می شود. از نظر کاتالیتیک، هنگامی که دانه های سیر شکسته می شوند، آنزیم آلییناز (آلئین لیاز) موجود در واکوئل های سلولی، با آلئین آزاد شده از سیتوپلاسم سلولی ترکیب شده و تولید آلیسین می نماید [۲۰، ۲۱]. آلیسین به عنوان مسئول بوی تند سیر شناخته شده و از نظر شیمیایی، مولکولی فرار و بسیار واکنش پذیر به شمار می رود. یافته های لاوسون^۲ و همکاران [۲۲، ۲۳] نیز نشان می دهند که مولکول های آلیسین بسیار ناپایدار بوده و در شرایط درون تنی (*in vivo*) به سرعت به ترکیبات ثانویه ای مانند آلیل مرکاپتان تبدیل می گردند. از آنجا که سنتز بیش از حد آلیسین می تواند برای بافت ها و آنزیم های گیاهی سمی باشد، تولید بسیار اندک و فعالیت کوتاه مدت این ماده، که محدود به مناطق مورد هجوم عوامل میکروبی است، آسیب های سلولی بالقوه در گیاه را به حداقل می رساند [۱۴]. آلیسین می تواند از طریق فرایند مبادله تیول- دی سولفید، با گروه های تیول آزاد آنزیم های مختلف وارد واکنش شود [۲۴، ۱۴]. آنکری^۳ و همکاران [۲۵] طی مطالعه ای دریافتند که آنزیم های حاوی گروه SH از قبیل سوکسینیک دهیدروناز، اوره آز، پاپائین، زانتین اکسیداز، کولین اکسیداز، هگزوکیناز، کولین استراز، تریوز فسفات دهیدروناز، الکل دهیدروناز و سیستمین پروتئاز توسط آلیسین مهار می شوند. بعلاوه فوک^۴ و همکاران [۲۶] نیز مشاهده نمودند که اتصال غیر

1-Shobana

2-Lawson

3-Ankri

4-Focke

اشرشیا کولی (UC 103) بودند. محیط های کشت مورد استفاده در این مطالعه شامل آبگوشت انفوزیون برین- هارت (BHI)، آگار انفوزیون برین- هارت (BHA) و آگار سالمونلا- شیگلا (SS) بودند که از شرکت مرک^۲ (آلمان) خریداری شدند. سیر (*Allium Sativum*) مورد استفاده در بررسی حاضر از شرکت کشت و صنعت همدان (همدان، ایران) تهیه گردید. قرص های سیر (Garlet) نیز از شرکت داروسازی کوثر (کوثر، تهران، ایران) خریداری شدند.

در این مطالعه، عصاره های آبی سیر بر اساس روش باکری و داگلاس^۳ [۱۵] تهیه گردیدند. در این روش سیرهای تازه، شسته شده، پوست گیری شده، تمیز گردیده، قاچ قاچ شده و به مدت ۷ روز در هوای آفتابی (سایه) خشک گردیدند. سپس قاچ های سیر با آسیاب برقی (Moulinex) بصورت پودری همگن درآمدند. ۱۰ gr از این پودر به ظرفی حاوی ۱۰۰ ml آب مقطر استریل منتقل شد. این ظرف به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و تحت شرایط لرزش (دستگاه شیکر JSH-20CH, Jahl) با دور چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه (RPM) انکوبه گردید. عصاره خام حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. مایع رو از کاغذ واتمن شماره ۱ گذرانده شده سپس با عبور از فیلترهای استریل ۰/۴۵ μm (شرکت Schleicher & Schuell, آلمان) پالایش گردید. غلظت نهایی سیر در عصاره بدست آمده ۱۰۰ mg/ml اندازه گیری شد. عصاره حاصل در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

هر کدام از قرص های تهیه شده برای این بررسی ۴۰۰ mg وزن داشتند. دو قرص سیر به یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری که حاوی ۵۰ ml آب مقطر استریل بود، منتقل شده و با شیکینگ مداوم کاملاً حل گردیدند. با اضافه نمودن ۵۰ ml آب مقطر استریل، مایع موجود در بالن ژوژه به حجم رسانده شد، سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و تحت شرایط لرزش (دستگاه شیکر JSH-20CH, Jahl) با دور چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه

کووالانسی و برگشت پذیر آلیسین به استیل کوآنزیم A سنتتاز موجب مهار اختصاصی این آنزیم می گردد. آلیسین از طریق واکنش با آنزیم ها، مهار رادیکال ها و نیز نفوذ پذیری از طریق فسفولیپید های غشاء، فعالیت های بیولوژیک خود را به انجام می رساند [۲۷،۲۱]. اثرات ضد میکروبی این ماده نیز به واسطه واکنش شیمیایی آن با گروه های تیول آنزیم هایی مانند RNA پلیمرز و به تاخیر انداختن و یا مهار سنتز DNA، RNA و پروتئین ها رخ می دهد [۱۴]. اخیراً لیزین و ان جی^۱ [۲۸] پروتئین ضد قارچی را با وزن مولکولی ۱۳ KDa از سیر استخراج نموده و آن را آلیومین (Alliumin) نامیدند. آلیومین دارای فعالیت ضد قارچی بر علیه میکوسفارا آراشیدیکولا، اثر ممانعت کنندگی بر روی باکتری سودوموناس فلورسنس و خاصیت ضد پروليفراتیو بر روی سلول های L1210 لوسمی می باشد.

علت عمده مرگ و میر در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، اسهال و التهابات معدی- روده ای می باشند که باکتری هایی از قبیل سالمونلا، شیگلا و اشرشیاکولی به عنوان عوامل اصلی به وجود آورنده آنها به شمار می روند [۲۹]. در ایالات متحده آمریکا سالیانه حدود ۴۵۰۰۰-۳۵۰۰۰ مورد ابتلا به شیگلوز گزارش می گردد. اشرشیاکولی نیز به عنوان مسئول حدود ۳۰-۲۰ فقره از موارد شیوع اسهال در کشور های در حال توسعه شناخته شده است [۳۰]. این مطالعه جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی غلظت های مختلف عصاره آبی پودر سیر (AEGP) و عصاره آبی قرص سیر (AEGT) بر روی تعدادی از باکتری های گرم منفی عامل اسهال شامل سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتریه و اشرشیا کولی، در شرایط آزمایشگاهی طراحی و اجرا گردید.

روش کار

میکروارگانیزم های مورد آزمایش از کلکسیون کشت میکروبی بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. این ارگانیزم ها شامل سالمونلا تیفی موریوم (UT 104)، شیگلا دیسانتریه (UCC 101) و

2-Merck

3-Bakri & Douglas

1-Lixin & Ng

قابل مشاهده نبود، بوسیله ورتکس میکس شده و سپس $100 \mu\text{l}$ از هر کدام از آنها در پلیت های حاوی آگار BHA و آگار SS کشت فرعی داده شدند. پلیت های کشت شده برای تعیین MBC عصاره سیر، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. در این مرحله، پایین ترین غلظتی از عصاره سیر که در آن رشد باکتری قابل مشاهده نبود، به عنوان MBC عصاره برای آن باکتری در نظر گرفته شد.

روش مورد استفاده برای ارزیابی تاثیر AEGT بر روی ارگانسیم های مورد آزمایش، مشابه بررسی فعالیت AEGP بود، منتهی رقت های سریالی تهیه شده از این عصاره، در محدوده غلظتی 80 mg/ml - $2/5$ قرار داشتند. در بررسی حاضر، همه آزمایش ها در سه دوره تکرار گردیده و نتایج حاصل بوسیله نسخه ۱۷ نرم افزار SPSS و روش آماری Student tTest آنالیز شده و در طی آن $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه، اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف AEGP و AEGT بر روی سه باکتری گرم منفی عامل اسهال شامل سالمونلا تیفی موریوم (UT 104)، شیگلا دیسانتریه (UCC 101) و اشرشیا کولی (UC 103) در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی حاضر نشان می دهد که MIC، AEGP بر روی سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتریه و اشرشیا کولی به ترتیب

(RPM) انکوبه گردید. مابقی مراحل تهیه این عصاره مشابه روند آماده سازی AEGP بودند. غلظت نهایی سیر در عصاره تهیه شده در این مرحله 80 mg/ml اندازه گیری شد. در طی این بررسی، برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) AEGP بر روی میکروارگانسیم های مورد آزمایش، از روش استاندارد لوله ای (Standard Tube Test) استفاده گردید [۳۲، ۳۱]. در این روش ابتدا رقت های دو برابری سریالی AEGP در محدوده غلظتی 100 mg/ml - $3/12$ در لوله های استریل حاوی آگوش BHI تهیه شدند. دو لوله آزمایش نیز به ترتیب به عنوان کنترل های بدون AEGP و بدون باکتری در نظر گرفته شدند. ماده تلقیحی هر کدام از اجرام تحت آزمایش از کشت ۲۴ ساعته آنها در محیط آگوش BHI تهیه گردید. سوسپانسیون حاصل ابتدا با کدورت استاندارد $0/5$ مک فارلند تنظیم شده ($1 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$) سپس رقت آن به $1 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ تقلیل یافت. هر کدام از لوله های آزمایش با $100 \mu\text{l}$ از هر یک از ارگانسیم های مورد نظر تلقیح گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط اتمسفری هوای گرمخانه گذاری شدند. پایین ترین غلظتی از عصاره سیر که در آن رشد باکتری (از نظر کدورت) قابل مشاهده نبود، به عنوان MIC عصاره برای آن ارگانسیم در نظر گرفته شد. محتویات لوله هایی که در آنها رشد میکروارگانسیم ها

جدول ۱: میانگین نتایج به دست آمده از انجام سه دوره آزمایش برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عصاره آبی پودر سیر (AEGP) و عصاره آبی قرص سیر (AEGT) بر روی میکروارگانسیم های مورد مطالعه (mg/ml)

عصاره سیر				میکروارگانسیم های
AEGT		AEGP		تحت آزمایش
MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	
۸۰	۴۰	۲۵*	۱۲/۵*	سالمونلا تیفی موریوم (UT 104)
۸۰	۴۰	۲۵*	۱۲/۵*	شیگلا دیسانتریه (UCC 101)
۴۰	۲۰	۱۲/۵*	۶/۲۵*	اشرشیا کولی (UC 103)

* نشانگر معنی دار بودن تفاوت ها در مقایسه با AEGT در سطح $P < 0/05$.

۱۲/۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵mg/ml بود در حالیکه MIC، AEGT بر روی این میکروارگانیسم ها به ترتیب ۴۰، ۴۰ و ۲۰mg/ml بدست آمد. همچنین بررسی ما نشان داد AEGP، MBC بر روی اجرام فوق به ترتیب ۲۵، ۲۵ و ۱۲/۵mg/ml است ولی AEGT، MBC بر روی این باکتری ها به ترتیب ۸۰، ۸۰ و ۴۰mg/ml می باشد (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، در شرایط آزمایشگاهی، اثر ممانعت کنندگی و نیز فعالیت باکتری کشی AEGP بر روی باکتری های گرم منفی تحت آزمایش بطور معنی داری بیشتر از تاثیر AEGT بر روی این میکروارگانیسم ها بود ($P < 0.05$). بطور کلی همه باکتری های مورد مطالعه به هر دو عصاره آبی تهیه شده از سیر حساس بودند ولی حساسیت باکتری اشرشیا کولی به این عصاره ها بیشتر از بقیه بود.

بحث

سیر به عنوان چاشنی اصلی در غذاهای مختلف استفاده شده و باعث بهبود طعم و مزه آنها می گردد، همچنین با توجه به خواص دارویی این گیاه مانند قابلیت آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی آن، از سیر برای درمان بیماری های متعددی استفاده می شود [۳۳-۳۵]. سیر یکی از مهمترین گیاهان دارویی معطر می باشد که دامنه فعالیت ضد میکروبی وسیعی بر علیه انواع میکروارگانیسم ها اعم از عوامل بیماریزا و عوامل فساد یا مسمومیت غذایی دارد [۳۶، ۳۷، ۳۸، ۱۸]. عملکرد ضد میکروبی سیر بیشتر مربوط به حضور آلیسین در آن می باشد [۳۹]. فلد برگ^۱ و همکاران [۴۰] با انجام مطالعه ای، مکانیسم ضد میکروبی آلیسین را مورد بررسی قرار داده و مشاهده نمودند که پس از افزودن آلیسین به محیط کشت میکروارگانیسم ها، اثر ممانعت کنندگی آن بعد از دوره زمانی کوتاهی که "فاز تاخیری" نامیده شده و حدود ۱۵ دقیقه طول می کشد، شروع می شود. سپس "فاز ممانعت گذرا" آغاز می شود که طول آن با غلظت آلیسین رابطه مستقیم داشته و با دانسیته محیط کشت رابطه معکوس دارد. این محققین گزارش کردند که در شرایط آزمایشگاهی، مکانیسم ممانعت آلیسین از رشد

سالمونلا تیفی موریوم در غلظت های باکتریواستاتیک (۰/۵ - ۰/۲ mM) مربوط به ایجاد تاخیر یا ممانعت از سنتز DNA و پروتئین ها و نیز ممانعت سریع از سنتز لیپیدها و RNA می باشد که می توان از آنها به عنوان اهداف اولیه عملکرد آلیسین یاد کرد. در صورتی که تولید RNA کاهش یافته و یا ممانعت شود، سنتز پروتئین ها را نیز بطور چشمگیری تحت تاثیر قرار می دهد. این فرایند ممکن است در هر مرحله ای به دلیل فقدان mRNA، rRNA و یا tRNA متوقف شود. با جلوگیری از تولید اسیدهای آمینه و پروتئین ها، رشد ارگانیسم نیز متوقف می گردد چرا که این مواد برای تشکیل تک تک بخش های ساختار سلولی ضروری می باشند. همچنین اگر از سنتز لیپیدها ممانعت شود، تشکیل سایر بخش های سلول از جمله غشاء فسفولیپیدی دو لایه سلولی در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی با اختلال روبرو خواهد شد. از سوی دیگر عصاره سیر دارای پپتیدها یا پروتئین های ضد میکروبی می باشد که این پپتیدها اثر ضد باکتریایی خود را بر دامنه وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اعمال می کنند [۴۱]. تمام این فرایندها، شرایطی را بوجود می آورند که باکتری نتواند در حضور آلیسین یا AGE به رشد خود ادامه دهد [۲۱، ۲۷]. به نظر می رسد آلیسین و واکنش های مبادله تیول-دی سولفید آن با گروه های تیول آزاد آنزیم های مختلف، مکانیسمی است که به تمام این فعالیت ها منجر می شود. از اینرو اثر ضد باکتریایی سیر پخته شده و نیز قرص های سیر که بصورت تجاری در دسترس می باشند کمتر از تاثیر ممانعت کنندگی سیر خام است [۲۴، ۱۴]. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که فعالیت ضد باکتریایی عصاره حاصل از پودر سیر تازه بر روی میکروارگانیسم های تحت آزمایش بطور معنی داری بیشتر از عصاره حاصل از قرص دارویی سیر بود ($P < 0.05$).

الزواهی^۲ و همکاران [۴۲] با بررسی تاثیر عصاره سیر بر روی بعضی از گونه های انتروباکتریاسه، مشاهده نمودند که MIC این عصاره بر روی گونه های سالمونلا، گونه های انتروباکتر و اشرشیا کولی به ترتیب ۶/۲۵، ۱۲/۵ و

۱/۵۶٪ می باشد. داکا و آوول^۱ [۴۳] نیز طی مطالعه ای، عملکرد ضد باکتریایی عصاره آبی سیر را بر روی اشرشیا کولی، سویه های شیگلا و سویه های سالمونلا ارزیابی کرده و دریافتند که MIC این عصاره برای همه ارگانیزم های تحت آزمایش بالاتر از ۳۰mg/ml است ولی مقادیر MBC آن برای شیگلا و سالمونلا ۳۰mg/ml و برای اشرشیا کولی ۳۷/۵mg/ml می باشد. همچنین برهانو^۲ [۴۴] اثر سینرژیستی عصاره سیر را بر فعالیت ضد میکروبی عسل حاصل از زنبور گونه Trigonairi dipennis، بر روی اشرشیا کولی، سالمونلا، لیستریا مونوسیتوژنز، شیگلا فلکسنری، شیگلا دیسانتریه، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس آرنوس و استرپتوکوکوس پنومونیه مورد مطالعه قرار داده و دریافت که بین MIC مواد ضد میکروبی مورد آزمایش بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی تفاوت معنی داری وجود ندارد. بلگویت^۳ و همکاران [۳۸] نیز تاثیر عصاره آبی سیر را بر روی برخی سروواری های سالمونلا مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که این عصاره با محدوده MIC، ۱۰-۱۲/۵mg/ml و مقادیر MBC، ۱۳-۱۵mg/ml رشد سروواری های مورد مطالعه را متوقف کرده و یا آنها را از بین می برد. همچنین گول^۴ (Gull) و همکاران [۴۵] فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی، اتانولی و متانولی سیر را بر روی اشرشیا کولی، سودوموناس آئروجینوزا، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس آرنوس، کلیسیلا پنومونیه، شیگلا سونئی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سالمونلا تیفی مطالعه کرده و دریافتند که هم باکتری های گرم مثبت و هم باکتری های گرم منفی مورد آزمایش به عصاره های تحت مطالعه حساس بودند ولی حساسیت باکتری های گرم مثبت به این عصاره ها بیشتر بود. ایشان همچنین مشاهده نمودند که عصاره آبی سیر بر روی همه باکتری های تحت آزمایش به استثناء اشرشیا کولی و شیگلا، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی را اعمال نمود. شوبانا و همکاران [۱۸] نیز اظهار نمودند که غلظت های پایین عصاره آبی سیر از رشد باکتری های بیماریزای روده ای مانند اشرشیا

کولی، سالمونلا تیفی و شیگلا فلکسنری ممانعت می نماید. دوریراج^۵ و همکاران [۴۶] اثرات ضد میکروبی عصاره آبی سیر را بر روی ۱۷ جدایه باکتریایی با مقاومت دارویی چندگانه شامل استافیلوکوکوس آرنوس، سالمونلا تیفی، سودوموناس آئروجینوزا، اشرشیا کولی و گونه های پروتئوس مورد مطالعه قرار داده و مشاهده نمودند که محدوده MIC این عصاره بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت به ترتیب ۷-۲۱mg/ml و ۶-۱۱mg/ml می باشد. ایوالکن^۶ و همکاران [۱۱] نیز خواص ضد میکروبی عصاره آبی سیر را بر روی باکتری های دارای مقاومت دارویی چندگانه به روش انتشار گوده ای و رقت سازی بر روی برات مورد ارزیابی قرار داده و گزارش کردند که مناطق مهار رشد این عصاره بر روی سالمونلا و استرپتوکوکوس پنومونیه بطور معنی داری ($P < 0.05$) وسیعتر از این مناطق در اشرشیا کولی، لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرنوس است. صادقان و قزوینی [۱۹] گزارش کردند که سیر یک داروی ضد میکروبی طبیعی است که می تواند به عنوان جایگزینی برای درمان عفونت های معدی- روده ای مطرح باشد. همچنین سیوام (Sivam) [۱۷] نیز اثرات ضد باکتریایی عصاره سیر را بر روی هلیکوباکتر پیلوری، که با زخم های معده و سرطان معده در ارتباط می باشد، بررسی کرده و اظهار داشت که این عصاره بر روی فعالیت ضد میکروبی داروی امپرازول (Omeprazole) بر روی باکتری تحت آزمایش، اثر سینرژیستی دارد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، MIC عصاره سیر از ۶/۲۵mg/ml در مورد AEGP بر روی اشرشیا کولی تا ۴۰mg/ml در مورد AEGT بر روی سالمونلا تیفی موریوم و شیگلا دیسانتریه متفاوت می باشد که با نتایج حاصل از بررسی های سایر محققین [۴۲، ۳۸، ۱۱] همخوانی قابل توجهی دارد. در مقابل، سطح MIC های گزارش شده توسط داکا و آوول [۴۳] بیشتر و مقادیر MIC های مشاهده شده توسط شوبانا و همکاران [۱۸] کمتر از MIC های بدست آمده در طی مطالعه حاضر می باشد. نتایج ما نشان داد که غلظت هایی از عصاره های

1 - Daka&Awole

2 - Berhanu

3 - Belguith

4 - Gull

5 - Durairaj

6 - Iwalokun

این عصاره در شرایط درون تنی و استاندارد سازی دارویی آن و انجام ارزیابی های بالینی، مطالعات بیشتری لازم است. با توجه به فعالیت ضد باکتریایی پایین عصاره قرص های تجاری سیر نسبت به پودر سیر تازه، بایستی قرص ها، عصاره ها و سایر محصولات ضد میکروبی حاصل از سیر، در شرایطی که کمترین آسیب به آلیسین و پیش سازهای آن وارد شود، تهیه و ارزیابی گردند.

تشکر و قدردانی

در خاتمه از مساعدت و همکاری دانشگاه ارومیه بخصوص معاونت پژوهشی این دانشگاه (کد طرح پژوهشی ۸۲۷۴۵) و نیز پرسنل ساعی گروه بهداشت مواد غذایی که در مراحل انجام این طرح پژوهشی نهایت همکاری را داشته اند، کمال تشکر و قدردانی بعمل می آید.

سیر که بر روی اشرشیا کولی موثر بودند از غلظت های بدست آمده بر روی سایر باکتری های گرم منفی تحت آزمایش متفاوت بودند که نتایج کارهای قبلی نیز این یافته ها را تایید می نمایند [۴۲، ۴۳، ۴۵]. به نظر می رسد محتوای لیپیدی غشاء باکتری ها بر نفوذپذیری آلیسین و سایر عوامل ضد میکروبی سیر در این غشاها موثر باشند.

ترکیبات موثر موجود در عصاره های سیر مانند مقادیر آلیسین و دی آلایل سولفید این عصاره ها، تحت تاثیر روش های مختلف تهیه آنها می باشد. بنابراین اختلاف بین سطوح MIC عصاره های سیر، انعکاسی از تفاوت در روش های استخراج این عصاره ها است. از سوی دیگر شدت و محدوده اثرات ضد باکتریایی عصاره سیر با محیط و شرایط اقلیمی کشت این گیاه نیز ارتباط مستقیم دارد. در مطالعه ای که توسط کاظمی زاده و همکاران [۴۷] انجام شد، اثرات ضد انتروکوکی عصاره سیر در مناطق جنوبی ایران (جیرفت) بیشتر از سیرهای کشت شده در مناطق شمالی کشور (بابل) بود. تنوع در جنس ها، گونه ها و یا سویه های باکتریایی تحت آزمایش نیز می توانند نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره سیر بر روی این میکروارگانیسم ها را تحت تاثیر قرار دهند. عواملی از قبیل تنوع در ترکیبات موجود در عصاره، مقادیر متفاوت این ترکیبات و اثر سینرژیستی آنها بر روی گروه های سولفیدریل موجود در محیط های کشت، فاکتورهای دیگری هستند که موجب اختلاف در نتایج بدست آمده می شوند [۱۱].

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر و سایر بررسی های مشابه نشان می دهند که سیر یک عامل ضد باکتریایی ارزان و سالم می باشد. یافته های این بررسی مشخص نمودند که می توان در شرایط آزمایشگاهی از عصاره آبی سیر بخصوص هنگامی که از پودر سیر تازه تهیه شده باشد، بر روی باکتری های گرم منفی شایع عامل اسهال شامل سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتریه و اشرشیا کولی بهره برد چرا که این عصاره قادر است در شرایط آزمایشگاهی از رشد میکروارگانیسم های مورد مطالعه ممانعت کرده و یا آنها را از بین ببرد. به نظر می رسد جهت بررسی اثرات

References

1. Fu YJ, Zu YG, Chen LY, Shi XHG, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res* 2007; 21:989–999.
2. Erdogrul OT. Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharm Biol* 2002; 40:269–273.
3. Komgeum J, Meli AL, Manfou RN, Lontsi D, Ngounou FN, Kuete V, Kamdem HW, Tane P, Ngadjui BT, Sondengam BL, Connolly JD. Xanthones from *Garcinia meathmannii* (Oliver) and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 2005; 66:1713–1717.
4. Ouahouo BM, Azebaze AG, Meyer M, Bodo B, Fomum ZT, Nkengfack AE. Cytotoxic and antimicrobial coumarins from *Mammea Africana*. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98:733–739.
5. Haciseferogullari H, Ozcan M, Demir F, Calisir S. Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum*). *J Food Eng* 2005; 68(4): 463–9.
6. Banerjee SK, Maulik SK. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J* 2002; 1:4.
7. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-Usmar VM, Doeller JE, Kraus DW. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *PNAS* 2007; 104:17977–17982.
8. Chauhan NB. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *J Ethnopharmacol* 2006; 108:385–394.
9. Fukao H, Yoshida H, Tazawa YI, Hada T. Antithrombotic Effects of odorless garlic powder both in vitro and in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71:84–90.
10. Hsing AW, Chokkalingam AP, Gao YT, Madigan MP, Deng J, Gridley G, Fraumeni JF. *Allium* vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1648–1651.
11. 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): 327–333.
12. Mahmoodi M, Islami MR, Karam AGR, Khaksari M, Sahebghadam LA, Hajizadeh MR, Mirzaee MR. Study of the effects of raw garlic consumption on the level of lipids and other blood biochemical factors in hyperlipidemic individuals. *Pak J Pharm Sci* 2006; 19:295–298.
13. Peng Q, BuzZard AR, Lau BH. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Med Sci Monit* 2002; 8:328–337.
14. Ankri S and Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 1999; 1:125–129.
15. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2005; 50(7): 645–51.
16. Hosseini-Jazani N, Shahabi S, Abdi-Ali A. In vitro antibacterial activity of garlic against isolates of *Acinetobacter* sp. *J Biol Sci* 2007; 7(5): 819–822.
17. Sivam GP. Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *J Nutr* 2001; 131(3s): 1106S–1108S.
18. Shobana S, Vidhya VG, Ramya M. Antibacterial activity of garlic varieties (*Ophioscordon* and *Sativum*) on enteric pathogens. *Current Res J BiolSci* 2009; 1(3): 123–126.
19. Sadeghian A, Ghazvini K. Antimicrobial activity of garlic extract against *Shigella*. *Inter J Mole Scies (IJMS)* 2002; 27(3): 142–144.
20. Curtis H, Noll U, Störmann J, Slusarenko AJ. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipinallicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol Mol Plant Pathol* 2004; 65:79–89.

21. Miron T, Rabinikov A, Mirelman D, Wilchek M, Weiner L. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1463:20–30.
22. Koch HP, Lawson LD. Toxicity, side effects and the unwanted effects of garlic. In: HP Koch and LD Lawson 1996; (Ed.) pp. 221–228.
23. Lawson LD, Wang ZL. Prehepatic fate of the organosulfur compounds derived from (*Allium sativum*). *Planta Med* 1993; 59(S):688-689.
24. Miron T, Feigenbalt G, Weiner L, Mirelman D, Wilchek M, Rabinikov A. A spectro- photometric assay for allicin, allin and alliinase (alliin-lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfonates. *Anal Biochem* 2002; 307:76-83.
25. Ankri S, Miron T, Rabinkov A, Wilechek M, Mirelman D. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytophathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1997; 41:2286-2288.
26. Focke M, Feld A, Lichtenthaler K. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS Lett* 1990; 261(1):106-108.
27. Rabinkov A, Miron T, Konsrantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379:233-244.
28. Lixin Xia, Ng. TB. Isolation of alliumin, a novel protein with antimicrobial and antiproliferative activities from multiple-cloved garlic bulbs. *Peptides* 2005; 26:177–183.
29. Monica C. District laboratory practice in tropical countries. 2ndEd. Cambridge Univ press 2000; 2:136-167.
30. Muray P, et al. *Medical Microbiology*. 4thEd. Mosby London, 2002; pp: 273-274.
31. Akinyemi K, Oladapo O, Okwara CE, IbeFasure KA. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in Southwest Nigerian orthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC Complement Altern Med* 2005; 5:6.
32. Muray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. 2ndEd. USA: ASM press 1995; pp: 1405-1413.
33. Hosseinzadeh H, Behravan J, Ramezani M, Sarafraz S, Taghiabadi E. Study of antitumor effect of methanolic and aqueous extracts of *Allium sativum* L. (Garlic) cloves using potatodisc bioassay. *Pharmacol* 2011; 1: 881-888
34. Londhe VP, Gavasane AT, Nipate SS, Bandawane DD, Chaudhari PD. Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases: an overview. *J Pharma Res Opinion* 2011; 1 (4): 129 134.
35. Rahman MM, Fazlic V, Saad NW. Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract. *Inter Food Res J* 2012; 19 (2): 589-591
36. Alorainy MS. Evaluation of antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*) against *E. coli* O157:H7. *J Agricult Vet Res Sci* 2011; 4(2): 149-157.
37. Aneela F, Tauqeer A, Shaistaj K, Deebe F, Zaidi N. Assessment of antibacterial activity of in vitro and in vivo grown garlic (*Allium sativum* L.). *Pakistan J Bot* 2001; 43 (6): 3029-3033.
38. Belguith H, Kthiri F, ChatiA, Abu Sofah A, Ben Hamida J, Landoulsi A. Study of the effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some *Salmonella* serovarsisolates. *Emir J Food Agricul* 2010; 22 (3): 189-206.
39. Harris JC, Cottrell SL, Plummer S. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 57: 282-286.

40. Feldberg RS, Chang SC, Kotik AN, Nadler M, Neuwirth Z, Sundstrom DC, Thompson NH. In vitro mechanism of inhibition of bacterial growth by allicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:1763-1768.
41. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415:389-395.
42. Alzowahi FAM, Abu-Taleb A, As-Suhbani A, Kadam TA. The inhibitory effects of garlic extract and its fractions against some Enterobacteriaceae spp. isolated from sprouted Mung bean. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2013; 2(7): 104-115.
43. Daka D and Awole M. Assessment of the antibacterial effect of crude preparation of garlic (*Allium sativum*) on diarrhea causing bacteria: an In vitro, study. *Asian J Med Sci* 2009; 1(1): 12-14.
44. Berhanu A. Synergistic antimicrobial effect of Tenegn Honey (*Trigonairi dipennis*) and garlic against standard and clinical pathogenic bacterial isolates. *Inter J Microbiol Res* 2013; 4 (1): 16-22.
45. Gull I, Mariam S, Halima Sh, Shahbaz MA, Zahoor QS, Amin MA. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Annals Clinic Microbiol Antimicrobials* 2012; 11:8.
46. Durairaj S, Sangeetha S, Lakshmanaperumalsamy P. In vitro antibacterial activity and stability of garlic extract at different pH and temperature. *Electronic J Biol* 2009; 5(1): 5-10.
47. Kazemizadeh Z, Tashakori M, Rezaeian M. Comparison of antibacterial effects of garlic extract with two intracanal irrigantson *Enterococcus faecalis*. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2011; (Persian) 10(1): 3-13.

In Vitro antibacterial properties of aqueous extract of garlic against on common diarrhea causing bacteria

Original
Article

Ghadimipour R^{1,2*}, Sedigh-Eteghad S³, Chalangar R⁴, Alipoor-yeganeh M⁵, khadiri B⁶, Afkari Gh⁶

¹Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Ahwaz, Iran

²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran

³Neurosciences Research Center (NSRC), Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴MSc of Soil Biology, Islamic Azad University, Ahwaz, Iran

⁵Doctor of Veterinary Medicine (DVM), Urmia University, Urmia, Iran

⁶Doctor of Veterinary Medicine (DVM), Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding author: Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Ahwaz, Iran.

Email: Ghadimipoorrahim@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Garlic (*Allium sativum*) has been considered to be an excellent medical panacea and a natural antimicrobial agent that can be used as an alternative form of treatment of pathogenic infections. The aim of this study was to assess the effect of different concentrations of aqueous extract of garlic powder (AEGP) and aqueous extract of garlic tablet (AEGT) against three gram-negative diarrhea causing bacteria including *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli*, in vitro.

Material and Methods: In this research, aqueous extracts of garlic were prepared using Bakri and Douglas method. Also Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of AEGP and AEGT were tested through Standard Tube Test. Data were analyzed by Student t Test of SPSS software.

Results: The MICs of AEGP and AEGT against on *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli* were 12.5, 12.5, 6.25 mg/ml and 40, 40, 20 mg/ml respectively. The MBCs of AEGP and AEGT on tested microorganisms were 25, 25, 12.5 mg/ml and 80, 80, 40 mg/ml respectively. The results of present study showed that the inhibitory and bactericidal effects of AEGP was much more than that of AEGT ($P < 0.05$), either on tested microorganisms in vitro.

Conclusion: The results of our research indicated that aqueous extract of garlic (AEG) especially AEGP have significant antibacterial effects on the tested diarrhea causing microorganisms, in vitro. Further studies will be needed for pharmacological standardization and clinical evaluation of garlic aqueous extract, in vivo.

Key words: Garlic aqueous extract (GAE), Allicin, Diarrhea

Journal of North Khorasan University 2015;7(1):357-367

Received: 8 Feb 2015

Revised: 3 Mar 2015

Accepted: 10 Mar 2015