Review مراجعات

دراسة الفعالية المضادة للجراثيم للمستخلصات المائية لنبات الثوم

إحسان عيدان عبد الكريم السيمري[1]

الخلاصة

تمت دراسة الفعالية المضادة للجراثيم للمستخلصات المائية لأبصال الثوم ***Allium sativum*** على الجراثيم الممرضة الموجبة والسالبة الغرام. ووجد أن 4–12 ساعة بعد الاستخلاص ودرجات الحرارة 30–50 س تعتبر أفضل الظروف للوصول إلى الفعالية القصوى المضادة للجراثيم التي تتميز بها مستخلصات أبصال الثوم، بينما تسبب درجات الحرارة 70–100 س تثبيط هذه الفعالية. كما تبين أن التراكيز 500–1000 مكروغرام/مل للمستخلصات المائية ترفع معدل قتل الجراثيم الممرضة المدروسة إلى حوالي 100% مع وجود بعض الاستثناءات.

المقدمة

ينتمي نبات الثوم ***Allium sativum*** إلى الفصيلة الزنبقية Liliaceae. ويضم هذا الجنس أنواعا أخرى كالبصل *A. cepa* والكراث *A. porrum* [1]. ولقد أصبح معروفا منذ الستينات أن لنبات الثوم آثارا مفيدة في نطاق واسع من الأمراض البشرية، فقد ثبت أنه مفيد في الوقاية من الأمراض القلبية والوعائية ومن التخثر، كما أنه يخفض ضغط الدم المرتفع. وتجرى البحوث في بلدان عديدة حول تأثيراته ضد السرطان وفعاليته المضادة للأكسدة. وقد اعتبرت إدارة الأغذية والأدوية الأمريكية (FDA) الثوم وزيته من مجموعة المواد الغذائية المأمونة ***Generally regarded as safe (GRAS)*** [2]. ويحتوي الثوم على العديد من المواد الفعالة مثل السيستين بمقدار 2.4 مكروغرام/غ، والمثيونين بمقدار 2.6 مكروغرام/غ، والسلينوم بمقدار 0.0582 – 4.25 مكروغرام/غ من الثوم. إلا أن المادة الأكثر فعالية في أبصال الثوم هي مركب الأليوم Allium البروتيني [3]. ولقد أجري العديد من الدراسات في أقطار مختلفة من العالم حول استخلاص المواد الفعالة المضادة للجراثيم من أبصال الثوم [5,4]. كما تمت دراسة تأثير هذه المستخلصات على أنواع مختلفة من الجراثيم. حيث أشارت الدراسات إلى أن المواد الفعالة في الثوم المسماة آليسين Allicin تؤثر في كل من الجراثيم الإيجابية والسلبية الغرام كجرثومتي الإشريكية القولونية ***Escherichia coli*** والسلمونيلة التيفية ***Salmonella typhi***، كما أنها تمنع نمو المتفطرات السلية ***Mycobacterium*** tuberculosis [7,6]. وتفقد هذه المواد فعاليتها بعد غليانها أو تعقيمها بجهاز التعقيم (الموصدة autoclave)، أو عند خزنها مدة طويلة، أو بعد إضافة مواد كيمياوية معينة لها [9,8].

---

1. فرع الأحياء المجهرية بكلية الطب، جامعة البصرة، جمهورية العراق

تاريخ الاستلام 1998/6/10 – تاريخ القبول 1998/11/24

A study of antibacterial activity of aqueous extracts of Allium sativum L. (Liliaceae). Ihsan Edan A. Al-Saimary, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Basra, Iraq.

ويهدف البحث الحالي إلى دراسة الفعالية الحيوية المضادة للجراثيم للمستخلصات المائية لأبصال الثوم على الجراثيم المرضة المختلفة، وإلى تحديد الظروف المثلى لاستخلاص المواد الفعالة منها، وتأثير درجات الحرارة المختلفة على فعاليتها.

المواد وطرائق العمل

تحضير المستخلصات المائية لأبصال الثوم

تم الحصول على أبصال نبات الثوم من الأسواق المحلية. وغسلت هذه الأبصال جيداً بالماء المقطر عدة مرات. وتم وزن 100 غرام من الأبصال وأضيف إليها 100مل من الماء المقطر في زجاجة خلاط كهربائي معقمة. ثم مزج الخليط فيها لمدة 10 دقائق وُضع بعدها المخلول في منبذة centrifuge تدور بسرعة 5000 دورة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة. وأخذ السائل الطافي وتم ترشيحه باستخدام مرشح سايتز Seitz المعقم (ذو ثقوب أقطارها 0.45 مكرون). وجمع الراشح في قنينة معقمة، واعتبر هو المستخلص المائي لأبصال الثوم بتركيز 1:1.

واستخدم المستخلص المائي لأبصال الثوم في تجارب تأثير العوامل المختلفة على الفعالية المضادة للجراثيم، وحضرت منه تراكيز مختلفة (50، 100، 250، 500، 750، 1000 مكروغرام/مل).

الجراثيم المدروسة

استخدمت عشرة أنواع من الجراثيم المرضة المعزولة من الحالات السريرية والمشخصة باتباع الطرق العلمية المعروفة [14,13].

تأثير مدة الاستخلاص ودرجات الحرارة المختلفة على فعالية المستخلصات المائية للأبصال

تركت مستخلصات الثوم المائية بتراكيز 100، 500، 1000 مكروغرام/مل لفترات زمنية هي 2، 4، 6، 12، 24، 48، 72 ساعة في الثلاجة بدرجة حرارة 2–5° س. ومن ثم أجريت دراسة على فعاليتها ضد الأنواع المختلفة من الجراثيم بعد انتهاء كل فترة زمنية وكلا على حدة.

ولدراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة، عُرِّضت مستخلصات أبصال الثوم المائية بنفس التركيزات السابقة – إلى درجات حرارية مختلفة وهي 30، 50، 70، 90، 100° س لمدة عشر دقائق في حمام مائي. وبعد ذلك دُرست فعالية المستخلصات المائية المضادة للجراثيم المرضة لكل تعريض في كل درجة حرارة على حدة.

واعتماداً على نتائج تأثير مدة الاستخلاص، أجريت جميع التجارب اللاحقة لدراسة فعالية المستخلصات بعد حفظها لمدة 6 ساعات في الثلاجة بعد الاستخلاص.

حساب النسب المئوية لقتل الجراثيم

استنبتت الجراثيم المرضة في مرق نقيع القلب والدماغ brain–heart infusion broth (Difco) لمدة 18–24 ساعة في درجة حرارة 37° س. ثم وضع 0.1 سم من كل مزرعة في طبق بتري معقم (بحيث يكون عدد الجراثيم 10^3 جرثومة/مل باستخدام طريقة التخفيف). ثم أضيف التركيز المطلوب من المستخلصات المائية لأبصال الثوم. وبعدها أضيف وسط آغار مولرهنتون Mueller–Hinton agar (Oxoid) الذواب وخلط المزيج جيداً. وبعد تصلبه حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37° س لمدة 24 ساعة. وترك أحد الأطباق دون إضافة المستخلص المائي للثوم كمجموعة شاهدة. ثم فحصت الأطباق وحسبت النسب المئوية لقتل مختلف أنواع الجراثيم بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة وذلك لكل نوع جرثومي على حدة.

النتائج

يوضح الجدول (1) تأثير مُدَد الاستخلاص على فعالية المستخلصات المائية لأبصال الثوم المضادة للجراثيم الممرضة، حيث تبين أن زيادة مدة الاستخلاص تؤدي إلى زيادة نسبة قتل الجراثيم المختلفة. وتزداد هذه النسبة بزيادة التركيز المستخدم، وأن أقصى حد وصلته نسبة القتل للجراثيم كان في الفترة 4-12 ساعة بعد الاستخلاص. وينطبق ذلك على جميع التراكيز، ولكنه يختلف حسب النوع الجرثومي المتأثر حيث وصلت النسبة المئوية لقتل الجراثيم في الساعة السادسة والثانية عشرة بعد الاستخلاص إلى 98-100% لجميع الأنواع الجرثومية. ولذلك اعتمد الوقت 6 ساعات بعد الاستخلاص في جميع التجارب اللاحقة. كما لوحظ احتفاظ المستخلصات المائية لأبصال الثوم بفعاليتها لمدة 24-48 ساعة للتركيز 100 مكروغرام/مل و48-72 ساعة فأكثر للتراكيز 500 و1000 مكروغرام/مل. ووجدت أعلى نسبة قتل للجراثيم (80%) بعد مرور 72 ساعة من الاستخلاص للتركيز 1000 مكروغرام/مل للمكورات العقدية البرازية *Streptococcus faecalis* وأقلها (10%) لنفس التركيز والوقت لجرثومة النيسرية البنّية *Neisseria gonorrhoea*. وبدراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة على فعالية المستخلصات المائية لأبصال الثوم والموضحة نتائجها في الجدول (2) لوحظ زيادة نسب قتل الجراثيم المختلفة في درجات الحرارة 30°-50° س، وأن تلك النسب المئوية تزداد بزيادة التركيز. كما أن التركيز 1000 مكروغرام/مل أعطى نسبة هلاك 100% لجميع الأنواع الجرثومية في درجات الحرارة 30°-50° س. وقد لوحظ انخفاض فعالية التراكيز المختلفة مع زيادة درجة الحرارة إلى 70° س وانعدمت الفعالية المضادة للجراثيم في درجات الحرارة 90° س و100° س بعد 10 دقائق من تعريض المستخلصات المائية لهذه الدرجات الحرارية لجميع التراكيز المدروسة.

وبملاحظة الجدول (3)، نجد أن زيادة النسبة المئوية لقتل الجراثيم تتناسب طردياً مع زيادة التراكيز المستخدمة، حيث تبين أن أكبر تأثير للتركيز 50 مكروغرام/مل كان بنسبة قتل مقدارها 65% لجرثومة المكورة العقدية البرازية *Strep. faecalis* وأن أقلها (20%) لجرثومة العصوية الرقيقة *Bacillus subtilis*. وقد سجلت نسبة قتل للجراثيم مقدارها 100% للتراكيز 250-1000 مكروغرام/مل من المستخلصات المائية للثوم على الجراثيم الممرضة المختلفة ما عدا جرثومتي العصوية الرقيقة *B. subtilis* والنيسيرية البنيّة *N. gonorrhoea* حيث كانت نسبة القتل فيهما 90 - 92% على التوالي في التركيز الأول و98% لكليهما في التركيز الثاني.

المناقشة

توصلت الدراسة الحالية إلى العديد من الحقائق والإثباتات التي تؤكد احتواء الثوم على مواد فعّالة مضادة لنمو الجراثيم الممرضة المختلفة، كما تم التوصّل إلى الظروف المثلى لاستخلاص تلك المواد المضادة للجراثيم وتأثير درجة الحرارة على الفعالية ضد الجرثومية للمستخلصات المائية.

إن اعتبار الفترة 6 ساعات بعد الاستخلاص كفترة نموذجية لبلوغ المادة الفعالة الموجودة في الثوم إلى أقصى فعالياتها، إنما يعتمد على حقيقة أن إنزيم الآلينيز Allinase يحتاج إلى هذه الفترة الزمنية كي يعمل على المادة آلين Alliin الموجودة في الثوم لإنتاج المادة المضادة لنمو الجراثيم المسماة آليسين Allicin [*15*]. كما لوحظ انخفاض فعالية المستخلصات المائية لأبصال الثوم بعد هذه الفترة، وذلك لتحول الآليسين Allicin إلى مركبات ثلاثية وثنائية السلفيد di and trisulfides وإلى ثنائي أكسيد الكبريت SO_2. وبما أن هذه المواد هي مواد طيارة، وتتطاير حسب وزنها الجزيئي وتركيبها ودرجة الحرارة المعرضة لها، فإن قسماً منها يفقد بشكل تدريجي. ولذلك يكون نقصان المادة الفعالة بشكل تدريجي أيضاً [*17,16,3*]. إن احتفاظ المستخلصات المائية بفعاليتها لمدة 24-72 ساعة بحسب تركيزها أو

الجدول ١: تأثير مدة الاستخلاص على الفعالية المضادة للجراثيم لمستخلصات الثوم المائية

(عدد الخلايا الجرثومية لكل نوع جرثومي من المجموعات المعالجة بالمستخلصات والمجموعات الشاهدة: 1000 خلية جرثومية/مل)

الجراثيم	التركيز (مكروغرام/مل)	النسبة المئوية لقتل الجراثيم (%) وقت الاستخلاص بالساعات							
		0	2	4	6	12	24	28	72
الإشريكية القولونية	100	8	24	52	48	40	36	0	0
E. coli	500	48	60	96	95	88	50	20	6
	1000	70	88	100	100	100	100	100	50
أنواع الأمعائيات	100	20	48	66	60	52	26	10	0
Entrobacter sp.	500	32	66	100	100	82	44	18	0
	1000	56	84	100	100	100	100	100	60
أنواع الكلبسيلة	100	18	32	50	52	46	30	12	0
Klebsiella sp.	500	40	70	96	100	82	60	22	8
	1000	62	88	100	100	100	100	100	68
المتقلبة الرائعة	100	12	35	42	45	58	40	18	0
Proteus mirabilis	500	48	63	78	92	94	96	30	0
	1000	64	80	92	0	0	0	96	40
الزائفة الزنجارية	100	10	26	32	40	50	36	8	0
Ps. aeruginosa	500	44	53	71	86	90	68	30	12
	1000	68	70	88	100	100	100	92	48
العصوية الرقيقة	100	12	31	42	33	20	8	0	0
B. subtilis	500	40	57	86	82	64	43	24	6
	1000	56	83	100	98	98	94	90	35
العنقودية الذهبية	100	18	23	30	35	24	10	0	0
Staph. aureus	500	32	66	84	90	76	52	28	8
	1000	53	71	88	100	100	100	96	50
العنقودية البشروية	100	22	33	40	52	36	20	6	0
Staph. epidermidis	500	48	69	86	96	62	37	22	0
	1000	72	81	84	100	100	100	100	60
العقدية البرازية	100	28	43	52	65	48	18	0	0
Strept. faecalis	500	50	77	86	100	76	52	28	12
	1000	76	83	90	100	100	100	100	80
النيسرية البنيّة	100	15	21	28	20	12	8	0	0
N. gonorrhoea	500	43	59	86	80	58	32	16	0
	1000	67	88	100	98	96	62	28	10

الجدول 2: تأثير درجات الحرارة المختلفة على الفعالية ضد الجرثومية لمستخلصات الثوم المائية بعد تعريضها لمدة عشر دقائق

(عدد الخلايا الجرثومية لكل نوع جرثومي للمجموعات المعالجة بالمستخلصات والمجموعات الشاهدة: 1000 خلية جرثومية/مل)

الجراثيم	التركيز (مكروغرام/مل)	النسبة المئوية لقتل الجراثيم (%) درجة الحرارة (°س)				
		30	50	70	90	100
الإشريكية القولونية	100	40	60	20	0	0
E. coli	500	90	95	70	2	0
	1000	100	100	40	10	0
أنواع الأمعائيات	100	30	68	15	0	0
Entrobacter sp.	500	85	92	40	4	0
	1000	100	100	60	0	0
أنواع الكلبسيلة	100	52	80	20	0	0
Klebsiella sp.	500	66	92	56	3	0
	1000	100	100	70	15	0
المتقلبة الرائعة	100	40	56	25	0	0
Proteus mirabilis	500	70	88	45	0	0
	1000	100	100	50	5	0
الزائفة الزنجارية	100	32	64	20	0	0
Ps. aeruginosa	500	70	84	28	0	0
	1000	100	100	40	5	0
العصوية الرقيقة	100	36	48	0	0	0
B. subtilis	500	60	82	0	0	0
	1000	100	100	20	10	0
العنقودية الذهبية	100	46	68	0	0	0
Staph. aureus	500	70	90	10	0	0
	1000	100	100	30	8	0
العنقودية البشروية	100	50	84	12	0	0
Staph. epidermidis	500	76	88	46	0	0
	1000	100	100	40	5	0
العقدية البرازية	100	60	92	30	0	0
Strept. faecalis	500	80	88	12	4	0
	1000	100	100	60	10	0
النيسرية البنّية	100	30	66	4	0	0
N. gonorrhoea	500	82	94	25	0	0
	1000	100	100	20	5	0

الجدول 3: تأثير التركيزات المختلفة لمستخلصات الثوم المائية على الجراثيم المختلفة

الجراثيم	النسبة المئوية لقتل الجراثيم (%) التركيز (مكروغرام/مل).					
	50	100	250	500	750	1000
الإشريكية القولونية *E. coli*	48	68	81	95	100	100
أنواع الأمعائيات *Entrobacter sp.*	60	68	67	100	100	100
أنواع الكلبسيلة *Klebsiella sp.*	52	72	82	100	100	100
المتقلبة الرائعة *Proteus mirabilis*	45	68	80	92	100	100
الزائفة الزنجارية *Ps. aeruginosa*	40	62	70	86	100	100
العصرية الرقيقة *B. subtilis*	20	54	66	82	90	98
العنقودية الذهبية *Staph. aureus*	35	66	72	90	100	100
العنقودية البشروية *Staph. epidermidis*	52	64	80	96	100	100
العقدية البرازية *Strept. faecalis*	65	80	100	100	100	100
النيسرية البنيّة *N. gonorrhoea*	30	45	60	80	92	98

حسب الجرثومة التي تجري عليها التجربة يعود إلى إعادة تنظيم مادة الآليسين Allicin الذي يحصل تحت درجات حرارة منخفضة (درجة حرارة الثلاجة)، ولذلك يحتفظ مستخلص أبصال الثوم المائية بفعاليته المضادة للجراثيم المرضية. كما يدل هذا على أن ثبات المادة الفعالة في أبصال الثوم يكون أكبر في درجات الحرارة المنخفضة عنه في الدرجات العالية [8]. كما وجدت نتائج مشابهة في دراسة تينيكا وزوفياج [18] اللذين تمكنا من الاحتفاظ بالمادة الفعالة لمدة ثلاثة أشهر بعد خزن عصير الثوم في درجة حرارة – 10° س. كما ذكر سالم [3] أن المستخلص المائي للثوم يصل إلى أقصى فعالية له بعد 6 ساعات ويحتفظ بهذه الفعالية المضادة للعصويات الشمعية *Bacillus cereus* لغاية 48 ساعة للتراكيز 3% و5% و10%، كما أن فعالية الثوم المضادة للجراثيم تتناقص أثناء الخزن في درجات حرارة 16° س أكثر من الخزن في درجة حرارة 2° س [19].

ووجدت الدراسة الحالية أن درجة حرارة 30-50° س تسبب زيادة في الفعالية ضد الجرثومية للمستخلصات المائية لأبصال الثوم، ويعتمد هذا على زيادة نشاط إنزيم الآليناز Allinase المسؤول عن تحويل مادة الآلين Alliin إلى آليسين Allicin في هذه الدرجات الحرارية. وتختفي هذه الفعالية عند درجات الحرارة العالية (من 70 إلى 100° س)، وذلك بسبب تأثر أو تغير أو تخريب طبيعة المركبات الأولية آلين Alliin غير الفعالة أو الإنزيم آليناز Allinase، وبالتالي يقل أو يتوقف تكوين المادة الفعالة المؤثرة. وهذا يتوافق مع ما وجدته الدراسات الأخرى من أن درجة حرارة الغليان تبطل فعالية المادة المضادة للجراثيم في مستخلصات الثوم بالإضافة إلى زيادة فعالية المواد المضادة للعصويات الشمعية *Bacillus cereus* لمستخلصات الثوم في درجات الحرارة 20 – 50° س، وإلى إبطال فعالية مستخلص الثوم عند تعريضه لدرجات حرارة 70 – 80° س لمدة 5 دقائق [3].

أما بالنسبة لدراسة الفعالية المضادة للجراثيم الـمُمرضة التي تتمتع بها المستخلصات المائية لأبصال الثوم فقد أكدت الدراسة الحالية فعالية هذه المستخلصات على الجراثيم المختلفة. وتتباين هذه الفعالية حسب التركيز المستخدم أو الجرثومة التي أجريت عليها الدراسة. وتتوافق النتائج التي حصلنا عليها مع نتائج الدراسات الأخرى الخاصة بدراسة الفعالية المضادة للجراثيم لمستخلصات نبات الثوم ونباتات أخرى على أنواع جرثومية معينة [21,20,11,9,8,7]. كما تتوافق مع ما وجده الدليمي وزملاؤه [10] من أن مستخلص الثوم بتركيز 4% يمنع نمو جراثيم السلمونيلة التيفية *Salmonella typhi* والمكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus*، والإشريكية القولونية *E. coli* والشيغيلة الزحارية *Shigella dysenteriae*. وتتوافق مع دراسة سالم [3] التي وجدت أن استخدام المستخلص المائي للثوم بتركيز 5% و10% يؤدي إلى قتل جرثومتي العنقودية الذهبية والعصوية الشمعية على التوالي.

الاستنتاجات والتوصيات

1. للمستخلصات المائية لأبصال الثوم فعالية كبيرة مضادة للجراثيم وتتباين الأنواع الجرثومية في استجابتها لهذه المستخلصات باختلاف تركيز المستخلصات.
2. إن مدة 6 ساعات بعد الاستخلاص، ودرجة الحرارة 30 – 50° س تعتبر الظروف المثلى لوصول مستخلص الثوم المائي إلى قمة فعاليته في القضاء على الأنواع الجرثومية الممرضة.
3. إن درجات الحرارة 70 – 100° س تبطل فعالية مستخلصات أبصال الثوم.
4. نوصي باستمرار الدراسات في مجال دراسة المواد الفعالة المضادة للجراثيم في نبات الثوم وتحديدها ومعرفة تركيبها الكيميائي الجزيئي بشكل أدق وأشمل، بالإضافة إلى دراسة الفعالية ضد الجرثومية لنباتات أخرى كالبصل والكراث وغيرها من النباتات الطبية الهامة.

شكر وتقدير

يتقدَّم الباحث بالشكر والتقدير إلى الأستاذة المساعدة الدكتورة سندس صديق بكر، رئيسة فرع الأحياء المجهرية، بكلية الطب للمساعدات القيمة والتوجيهات السديدة التي قدَّمتها في سبيل إنجاز هذه الدراسة.

References

1. Lawrance GHM. *Taxonomy of vascular plants*. New York, Macmillan Company, 1951:413–6.
2. Food additives. Garlic and garlic oil, proposed affirmation of GRAS status as di-

rect human ingredient. *Federal register*, 1974, 39(185):34213–5.

3. Salim ZM. *Effect of aqueous garlic extract on* Bacillus cereus *and some other microbes, and on pepsin and trypsin.* Baghdad, College of Agriculture, University of Baghdad, 1978.

4. Han IJ, Lee MS, Chung KY. Isolation and characterization of alliin from garlic bulbs. *Journal of the Korean Agricultural and Chemical Society*, 1973,16(1):12–7.

5. Salzer U. Analytical evaluation of seasoning extracts (oleo resins) and essential oils seasonings. III. *International flavours and food additives*, 1975, 6(5):253–8.

6. Rudat KD. Comparative investigations of the antibacterial effect of various leek and cruciferous plants. *Qualitas plantarum et materiae vegetabilis*, 1969, 18(1):29.

7. Uchida Y, Takahzshi T, Sato N. The characteristics of the antibacterial activity of garlic. *Japanese journal of antibiotics*, 1975, 28(4):638–42.

8. Borukh IF et al. Bakteritsidnye cvoictba letuchnkh fraktsii fitontsidov chesnoka. [Bactericidal properties of volatile fractions of garlic phytoncides.] *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 1975, 11(3):378–9.

9. Wilson CR, Andrews WH. Sulfite compounds as neutralizers of spice toxicity for *Salmonella*. *Journal of milk and food technology*, 1976, 39(7):464–6.

10. Al-Delaimy KS, Ali SH. Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *Journal of science, food and agriculture*, 1970, 21:110.

11. Al-Delaimy KS, Barakat MM. Antimicrobial and preservative activity of garlic on fresh ground camel meat. *Journal of science, food and agriculture*, 1971, 22:96.

12. Al-Jasim HA, Barakat MM. Effect of some vegetable extracts on the activity of polygalacturonase. *Journal of science, food and agriculture*, 1973, 24(2):119–21.

13. Finegold SM, Baron EJ. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*, 7th ed. St Louis, CV Mosby Company, 1986.

14. Holt JG et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1994.

15. Schwimmer S, Mazetis M. Characterization of alliinase of *Allium cepa* (onion). *Archives of biochemistry and biophysics*, 1963, 100:66.

16. Brodnitz MH, Pascale JV, Derslice LV. Flavor components of garlic extracts. *Journal of agriculture and food chemistry*, 1971, 19(2):273.

17. Harborn JB. *Phytochemical methods*, 2nd ed. New York, Chapman and Hall, 1984:150–257.

18. Tynecka Z, Zoflage S. The inhibitory action of garlic (*Allium sativum L.*) on growth and respiration of some microorganisms. *Acta microbiologica Polonica. Series B. Microbiologia applicata*, 1973, 5(1):51–62.

19. Bordta A et al. Effect of essential oils of garlic and onion on alimentary hyperlipemia. *Atherosclerosis*, 1975, 21(1):15–20.

20. Johnson MG, Vaughn RH. Death of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Applied microbiology*, 1969, 17(6):903.

21. Kavaiannoglou PG, Mantis AJ, Panetsos AG. The effect of garlic extract on lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* in culture media. *Journal of food science and technology*, 1977, 10(3):148–50.