

## The Antibiotic Efficacy of Metholic Extract of Ginger (*Zingiber officinale*) on some bacterial species

فعالية المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل

Ginger(*Zingiber officinale*)

تجاه بعض انواع البكتريا

م.م. شيماء اسماعيل كاظم

المدرس المساعد جامعة بغداد/كلية العلوم للنبات/قسم علوم الحياة

### الخلاصة

تم دراسة تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل (*Zingiber officinale*) تجاه اربعة انواع من البكتريا *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* باستخدام

طريقة انتشار القرص (*Disc diffusion method*) وطريقة التركيز المثبط الادنى (*Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*) والتركيز القاتل الادنى (*MBC*).

أظهرت النتائج ان للمستخلص الكحولي تأثيرا مثبطا تجاه نمو الاجناس البكتيرية المختبرة وكانت بكتريا *E.coli* هي الاكثر حساسية تجاه المستخلص الكحولي اذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (19.33 و20.67 و21.67) ملليمتر للتركيز (200 و300 و400) ملغم/مليتر على التوالي في حين كانت بكتريا *S. aureus* هي الاكثر مقاومة للمستخلص الكحولي اذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (10.33 و12 و12.67) ملليمتر للتركيز (200 و300 و400) ملغم/مليتر على التوالي. كما أظهرت النتائج ان التركيز المثبط الادنى (*MIC*) للاجناس البكتيرية الاربعة (*S.aureus*, *Pseudomonas Spp.*, *E.coli*, *S.typhi*) هو (0.6 و1.25 و2.5 و5)

مايكروغرام/مليتر على التوالي فيما كان التركيز القاتل الادنى (*MBC*) للاجناس البكتيرية اعلاه هو (1.25 و2.5 و5 و10) مايكرو لتر /مليتر على التوالي.

الكلمات المفتاحية: *Ginger (Zingiber officinale) extract . antibacterial , activity*

### Abstract

Disc diffusion method , Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were used to determine the antibacterial activity of methanolic extract of Ginger (*Zingiber officinale*) against: *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. The results showed an inhibitory effect of the methanolic extract on both the growth of the tested bacteria. *E.coli* was more sensitive to the methanolic extract, since the average of diameter of inhibition zones were (19.33, 20.67, 21.67) mm to the concentrations of (200, 300, 400) mg/ml respectively while *S.aureus* was more resistant to methanolic extract, since the average diameter of inhibition zones were (10.33, 12, 12.67) mm to the concentrations of (200, 300, 400) mg/ml respectively. The (MIC) of *E.coli*, *S.typhi*, *Pseudomonas spp.* and *S.aureus* were : (0.6, 1.25, 2.5, 5) µg/ml respectively and the (MBC) to the bacteria mentioned above were (1.25, 2.5, 5, 10) µg/ml respectively.

Key words : *Ginger (Zingiber officinale) extract . antibacterial . activity* .

### المقدمة :-

ان الامراض الناتجة عن تلوث الغذاء لاتزال مشكلة كبيرة في العالم في البلدان المتطورة [1] توجد انواع متعددة من الاحياء المجهرية مثل *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* تؤدي الي تلف الغذاء وهي واحدة من أهم مشاكل الصناعات الغذائية. لذا يجب استخدام المواد الحافظة الكيماوية للحفاظ على الصناعات الغذائية من التلف بالاحياء المجهرية. وفي الوقت الحاضر بدء الاهتمام باستخدام المضادات الحيوية الطبيعية مثل المستخلصات النباتية والتوابل التي بالاضافة الى اضافتها الطعم والرائحة المميزين للطعام فهي تعد كمضاد حيوي وكمضاد للسموم [1 و2 و3]

وقد استعملت المشتقات النباتية للاغراض الطبية منذ قرون , وفي الوقت الحاضر 80% من سكان العالم اصبحوا يقيمون المشتقات النباتية ويعتمدون على العقارات النباتية كدواء يلائم متطلباتهم الصحية [4 و5 و6] وبصورة عامة فإن الاعشاب والتوابل تعد أمينة وثبت بأنها فعالة ضد امراض محددة [5] وهي تستعمل بصورة واسعة في بلدان متعددة من اسيا و افريقيا منذ القدم ونظرا لأهميتها وفائدتها بدأ أستعمالها في الوقت الحاضر في الدول النامية بتزايد أيضا [5].

ومن هذه التوابل التي لها فعالية طبية هو نبات الزنجبيل (*Zingiber officinale*) , الذي يعود الى العائلة الزنجبيلية Zingiberaceae . الجزء المستخدم من النبات هو الجذور (rhizome) سواء الجذور الطرية او المجففة [4 و6]. من اهم التأثيرات الدوائية التي يمتلكها النبات كونه مضاد للتقيؤ ويساعد على التدفق الدموي ومضاد للسعال ومضاد للالتهاب وقاتل للجراثيم وخافض للحمى و الحرارة [7] وقد اظهرت العديد من الدراسات التي قام بها العلماء والباحثين أن للمستخلصات المائية والكحولية والزيت الطيار لجذور نبات الزنجبيل تأثيرا فعالا ومثبطا للعديد من الميكروبات ومنها البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والكثير من الانواع الفطرية [1 و2 و4 و5 و6 و8 و9].

لذا اجريت هذه الدراسة لأول مرة في العراق لمعرفة تأثير المستخلص الكحولي الميثانولي لجذور نبات الزنجبيل على نمو وفعالية بعض الاجناس البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام وذلك بأستخدام طريقة الانتشار بالاقراص وطريقة التخفيف الدقيقة باستخدام الوسط المغذي السائل (Broth microtiter dilution method) والتي تعطي نتائج اكثر دقة من بقية الطرق المستعملة [2].

## المواد وطرائق العمل :-

### 1- الأوساط الزرعية المستخدمة:-

حضرت الأوساط الزراعية المدرجة ادناه حسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid, USA) وهذه الأوساط هي:-  
وسط الاكار المغذي (NA) Nutrient Agar وأستعمل هذا الوسط لدراسة فعالية المستخلص النباتي تجاه العزلات البكتيرية.  
- وسط مولر-هنتون السائل Muller-Hinton Broth (MHB) أستخدم هذا الوسط لاجراء اختبار التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory concentration (MIC) للمستخلص النباتي قيد الدراسة .

### 2- تحضير المستخلص الكحولي الخام :- preparation of crude methanolic extracts

اتبعت طريقة [2] Nanasombat & Lohasupthawee , 2005 و [3] Abu-Shana *et al.*, 2005 :  
تم الحصول على جذور نبات الزنجبيل من الاسواق المحلية وغسلت وقطعت الى قطع صغيرة ثم طحنت وحضر المستخلص الكحولي بطريقة الاستخلاص المستمر بأستخدام جهاز (Soxhlet Extractor) اذ وضع 50 غرام من مسحوق جذور النبات الجافة في دورق زجاجي واضيف له 250 مليلتر من الكحول المثيلي 70% بنسبة (1:5 وزن/حجم) ، واستمرت عملية الاستخلاص لمدة 6 ساعات وبدرجة حرارة (60-70) م° ثم رشح المستخلص في قمع بوخزر تحت التفريغ و استخدم ورق ترشيح (Whatman No.1) وبعد الترشيح وزع المستخلص على اطباق ووضع الاطباق في الحاضنة بدرجة (37)م° لتركيز المستخلص ثم حفظ المستخلص في الثلاجة لحين الاستخدام .

### 3- العزلات البكتيرية :-

تم الحصول على العزلات البكتيرية *Escherichia coli* , *Pseudomonas spp* , *Salmonella typhi* , *Staphylococcus aureus* من مختبر الصحة المركزي التابع لوزارة الصحة حيث تم عزل الانواع البكتيرية من عينات مرضية شخصت هناك من خلال اجراء مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية لغرض التشخيص [12] .

### 4- تحضير عالق البكتريا:-

حضر العالق الكبتيري بتركيز 1.5×10<sup>8</sup> خلية حية / مليلتر باتباع طريقة (Atlas and Park (1995) [10] والصادق (2005) , [11] وذلك بنقل loop full من مستعمرة البكتريا النامية على وسط (NA) الى انبوب اختبار حاو على 10 مليلتر وسط (NB) المعقم. وحضن مدة 24 ساعة بدرجة حرارة (37) م°. وبعد انتهاء مدة الحضن عملت سلسلة من التخفيف العشرية للمزروع البكتيري, وحددت الكثافة الضوئية للمزروع المخفف بأستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) على طول موجي (600) نانوميتر . [13]

### 5- اختبار فعالية المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل في تثبيط نمو الانواع البكتيرية:-

أستخدمت طريقة الانتشار بالاقراص (disc diffusion technique) اعتمادا على , Nanasombat & Lohasupthawee 2005 [2]:

أ- حضرت ثلاثة تراكيز من المسخلص الكحولي 20 و30 و40% وذلك بأذابة (200 و300 و400) ملغم من المستخلص الجاف في 1مليلتر من المذيب العضوي داي مثيل سلفو كسايد (DMSO) Dimethyl sulphoxide بتركيز 10%.

ب-نشر 200 مايكروليتر من عالق البكتريا على وسط (NA) بمساحة قطنية معقمة (swab) بشكل متساوي و بجميع الاتجاهات ثم تركت الاطباق لتجف .

ج-عمقت اقراص الورق النشاف بقطر 6 ملمتر ووضعت على سطح الوسط (NA) بواقع اربعة اقراص على سطح كل طبق .  
د- اضيف مباشرة 20 مايكرو ليتر من المستخلص على سطح القرص للتراكيز الثلاثة 20 و30 و40% على التوالي كما اضيف 20 مايكروليتر من المذيب العضوي بنسبة 10% (DMSO) على سطح القرص الرابع كمقارنة سالبة (negative control) بينما استخدم قرص 30 ملغم من المضاد الحيوي اموكسيسيلين Amoxicillin كمقارنة موجبة (positive control) وتركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة للسماح للمستخلص بالانتشار ثم حضنت الاطباق بدرجة 37م° ولمدة 24 ساعة، ثم قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر وقرنت النتائج مع الجداول القياسية المثبتة في National committee for clinical laboratory standards (NCCL) [14]

6- تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى (MIC) ولتركيز القاتل البكتيري الادنى (MBC) للمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل :-

- استخدمت طريقة التخفيف النصفية الدقيقة MICRO BROTH DILUTION METHOD اعتماد على الصادق (2005) [11] و Warnock (1989) [15] :

ا- حضرت سلسلة من التخفيف النصفية للمستخلص الكحولي بتراكيز (20 و10 و5 و2.5 و1.25 و0.6 و0.3) مايكرو غرام / مل بأنابيب اختبار معقمة حاوية على وسط مرق مولر هنتون (MHB) Muller Hinton Broth (MHB).

ب-لقت انابيب الاختبار بالعالق البكتيري بمقدار 100 مايكروليتر فضلا عن انابيب السيطرة الحاوية على وسط (MHB) مضاف اليه (DMSO) 10% واللقاح البكتيري ، رجت الانابيب جيدا وحضنت مدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م°.

ج-تم قراءة النتائج بمقارنتها بانابيب السيطرة لتقدير كثافة النمو وحددت قيمة (MIC) كاقبل تركيز للمادة المضادة التي تمنع ظهور عكارة واضحة للعين المجردة مقارنة بالسيطرة.

د-أخذ 100 مايكروليتر من كل تركيز ووضعت في طبق زجاجي معقم وصب الوسط الصلب المعقم والمبرد (45-50) م° ومزج جيدا لكي يتجانس الوسط الغذائي مع المزروع الذي يحتوي على (المستخلص النباتي والبكتريا و MHB) وتركت الاطباق لتتصلب ثم حضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة (24-48) ساعة ثم عملت ثلاث مكررات لكل تركيز، بعد ذلك تم حساب عدد المستعمرات النامية لكل تركيز ومقارنتها مع السيطرة [16].

#### 7- التحليل الاحصائي :-

اخذت البيانات لتأثير التراكيز المختلفة للمستخلص النباتي على كل من العزلات البكتيرية ، واستخرجت متوسطات المكررات الثلاثة لكل منها وحللت البيانات احصائيا وفق تصميم تام التعشبية بثلاث مكررات واستعمل اختبار دنكن متعدد الحدود بمستوى 0.05 لمقارنة المتوسطات الحسابية [17].

#### النتائج و المناقشة :-

اظهرت النتائج وجود تأثير مثبت للمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل ضد الاجناس البكتيرية المدروسة ففي التركيز 20% كانت اقطار هالة التثبيط (19.33,12.33,11.33,10.33) ملمتر للانواع *E.coli* , *Pseudomonasn spp.* , *S.aureus* , *S.typhi* على التوالي. اما اقطار هالة التثبيط في التركيز 30% كانت (20.67,12.67,13.67,12) ملمتر لنفس الانواع اما اقطار هالة التثبيط للتركيز 40% فقد كانت (21.67,14.67,14.33,12.67) ملمتر لنفس الانواع على التوالي. اذ لوحظ زيادة قطر هالة التثبيط بزيادة تركيز المسخلص، بينما كان قطر هالة التثبيط للمضاد الحيوي Amoxicilin هي (30, 30) (15, 15) ملمتر للانواع *S.typhi* , *S.aureus* , *E.coli* بينما كان قطر هالة التثبيط (0) للنوع *Pseudomonasn spp.* وكما موضح في جدول رقم (1)

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي (اختبار دنكن ) وجود فروق معنوية عالية تحت مستوى احتمالية (0.05,0.01)  $p <$  بالنسبة للتراكيز الثلاثة (200 و300 و400) ملغم/مليتر كما ظهر وجود فرق معنوي بين العزلة *E.coli* وبقية العزلات *Pseudomonas spp.* و *S.typhi* و *S.aureus* للتراكيز الثلاثة (200 و300 و400) ملغم/مليتر اذ كانت هي الاكثر حساسية اما العزلة *S.aureus* فكانت الاكثر مقاومة للتراكيز الثلاثة للمستخلص النباتي .

جدول رقم (1) معدلات اقطار هالة التثبيط بالمليمترا لنوع البكتيرية الاربعة

المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل			Amoxicilin 30mg/ml	السيطرة DMSO %10	التراكيز الانواع البكتيرية
400 mg/ml	300 mg/ml	200 mg/ml			
21.67 a	20.67 a	19.33 a	30	0	<i>Escherichia coli</i>
14.67 b	12.67 b	12.33 b	0	0	<i>Pseudomonas spp.</i>
14.33 b	13.67 b	11.33 bc	30	0	<i>Salmonella typhi</i>
12.67 c	12.00 b	10.33 c	15	0	<i>Staphylococcus aureus</i>

الحروف المختلفة عموديا (a,b,c) يعني وجود فرق معنوي متناقض عند مستوى احتمالية ( $P < 0.05$ )

اما بالنسبة للتركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل البكتيري (MBC) للمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل ضد الانواع الاربعة المدروسة *S. aureus*, *S. typhi*, *Pseudomonas spp.*, *E. coli*. فقد وجد ان قيمة (MIC) للانواع البكتيرية هو (0.6 و 1.25 و 2.5 و 5) مايكرو غرام /مليتر للانواع *S. aureus*, *S. typhi*, *Pseudomonas spp.*, *E. coli* على التوالي في حين كان التركيز القاتل الادنى (MBC) ليكتريا *E. coli* هو (1.25) و (5) ليكتريا *Pseudomonas spp.* و *S. typhi* و (2.5) هو وليكتريا *S. aureus* هو (10) مايكرو غرام /مليتر. جدول رقم (2).

جدول رقم (2) التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل ضد الاجناس البكتيرية الاربعة.

MBC µg/ ml	MIC µg/ ml	الانواع البكتيرية
1.25	0.6	<i>Escherichia coli</i>
5	2.5	<i>Pseudomonas spp.</i>
2.5	1.25	<i>Salmonella typhi</i>
10	5	<i>Staphylococcus aureus</i>

اظهرت النتائج ان للمستخلص الكحولي الميثانولي لجذور نبات الزنجبيل تأثيرا مثبطا تجاه نمو الانواع البكتيرية المختبرة اذ يتميز المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل بأحتوائه على (zingiberene , farnescene) كأكبر مكونين رئيسين فضلا عن احتوائه على مركبات (gingerone , phellandrene , geranionl , curcumene , bisabolene) -β وهي من المركبات التربينية (terpenes) المهمة والفعالة من الناحية الطبية [4,1] مما يعزى اليه تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل على البكتريا الموجبة والسالبة لصيغة كرام اذ تعمل هذه المركبات التربينية على تحليل جدار الخلية واضعاف الفعاليات الحيوية للخلية البكتيرية وذلك من خلال التداخل مع وظيفة الغشاء السايترولازمي متمثلة بعملية بناء البروتين وبالتالي تثبيط وايقاف هذه العملية وكذلك اعاقا عملية النقل الفعال للايونات و الاملاح عبر هذا الغشاء [18].

اذ ان كلا من المستخلصات الكحولية الايثانولية والميثانولية والزيت الطيار لجذور نبات الزنجبيل تحتوي على نفس المركبات الفعالة تقريبا لذا يتضح من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة انها تتطابق مع مذكره [4] والذي اوضح من خلال دراسته ان للمستخلص الكحولي لجذور الزنجبيل تأثيرا مثبطا لنمو بعض الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصيغة كرام وبعض

الفطريات في حين جاءت بعض النتائج مخالفة لما ذكره [1] والذي اوضح من خلال دراسته ان للزيت الطيار لجذور نبات الزنجبيل تأثيرا مثبتا للبكتريا الموجبة لصبغة جرام في حين لم يكن له تأثيرا مثبتا للبكتريا السالبة لصبغة جرام قيد الاختبار, في حين جاءت بعض الدراسات موافقة لما جاء في هذه الدراسة اذ اوضح كلا من [8,5] ان للمستخلص المائي لجذور نبات الزنجبيل تأثير مثبتا للبكتريا السالبة لصبغة جرام قيد الدراسة *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella typhi* ويعزى هذا التأثير الى قدرة المستخلص النباتي الى تثبيط تضاعف بكتريا القولون *E.coli* اذ تخمر هذه البكتريا الكربوهيدرات غير المهضومة مما يؤدي الى امتلائها بالغازات، هذا مما يجعلها تتأثر بالمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل كمضاد لها. [4] في حين لم تتفق الدراسة مع ما جاء في دراسة [2] الذي اوضح في دراسته ان المستخلص الكحولي ليس له تأثير مثبت في حين كان للزيت الطيار تأثير مثبت على البكتريا السالبة لصبغة جرام. كما ان الدراسة لم تتفق مع ما جاء في دراسة [19] الذي اوضح في دراسته انه لم يكن للمستخلص المائي والكحولي لجذور نبات الزنجبيل تأثيرا مثبتا للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام قيد الدراسة *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*. وهذا يعود الى سببين هما الموقع الجغرافي المختلف للنبات اي اختلاف الظروف التي يزرع فيها النبات من بلد الى اخر وكذلك سلالة البكتريا قيد الاختبار. لذا فان الاستخدام اليومي للزنجبيل بوصفه احد انواع التوابل المستخدمة في الغذاء ربما سيساعد على الحماية من مختلف الامراض البكتيرية وربما يقود الى السيطرة على نمو البكتريا في الغذاء.

## المصادر

- 1-Norajit,K.;Laohakunjit N & O.Kerdchoechuen.(2007).Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils .Molecules .J.12:2047-2060.
- 2-Nanasombat ,S.& Lohasupthawee P. (2005). Antibacterial activity of crude ethanolic extract and essential oils of spices against *Salmonellae* and other enterobacteria . KMITLSci.Tech.J. 5(3):527-538.
- 3-Abu-Shanab,B.;Adwan,G. ;D.Abu-Safiya;K. Adwan. & M.Abu- Shanab.(2005). Antibacterial activity of *Rhus coria*.L.extracts of Gaza(Natural Sciences).13(2):147-153.
- 4-Gugnani,H.C.& Ezenwanze. E.C.(1985).Antibacterial activity of extract of ginger (*Zingiber officinale*)and African oil bean seed (*Pentaclethra macrophylla*).J.commun Dis .17:p233.
- 5-Indu,M.N.;Hatha,A.A.M.;C.Abirosh;U.Harsha&G.Vivekanandan.(2006). Antimicrobial activity of some of the south –Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*.Brazilian Journal of Microbiology.37:153-158.
- 6-James,M.E.; Nannapaneni R.&M.G.Johnson. (1999).Identification and characterization of two bacteriocinproducing bacteria isolated from garlic and ginger root .J.food.prot.62:p899.
- 7- شيفاليه, اندريه. العلاج الطبيعي بالنباتات الطبية لمختلف الامراض. (2005) مطبعة دار الرضوان ,سوريا,ص 181.
- 8-Nelson,C.Azu & Reginald ,A. Oneagba.(2007). Antimicrobial properties of Extract of *Allium cepa* (Onions) and *Zingiber officinal* (Ginger) on *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Bacillus subtilis*. The Internet Journal of Tropical Medicine ISSN. 3: (2). 1540-2681.
- 9-Weerasekera ,D.; Fernando. N. ;L.B.A.E.Bogaha-watta;R.Rajapakse-(2008) Bactericidal effect of selected spices ,medicinal plants and tea on *Helicobacter pylori* strains from Srilanka.J.Natn. Sci.Foundation Srilanka.36(1):91-94.
- 10-Atlas,R.M.;A.E.Brown & L.C. Parks .(1995). Laboratory Manual Experimental Microbiology. Mosby,St.Louis, London.
- 11-الصادق ,سرى مؤيد عبد المجيد. (2005). تأثير بعض المركبات الفعالة المستخلصة من حشيشة الليمون *Cymbopogon citrates* والزعتر *Thymus vulgaris* في انواع المبيضات والبكتريا المعزولة من افواه الاطفال المصابين بداء السلاق الفمي Oral Thrush رسالة ماجستير مقدمة الى كلية العلوم للنبات-جامعة بغداد . صفحة 112.
- 12-Holt,J.G.,Kreig,N.R.,Sneath,P,H.A.,Stanley,J.T.and Williams,S.T.(1994).Berges manual of determination bacteriology,9<sup>th</sup> ed.Williams & Wilkins,V.S,A
- 13-Rahman,M.U. & Gul. S. (2002).Antibacterial activity of hydodistilled essential oil of *Psammogeton canescens* N.O.umbelliferae. Biotechnol . 1(1) :55-60 .
- 14-Clinical and Laboratory Standards Insstitute ,performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.Approved standard.(2005).vol.25,8<sup>th</sup> edn,M02-A8 .

- 15-Warnock,D.W.(1989).Methods with antifungal drugs in :Medical Mycology.apractical approach. Evan,E.G.V.&M.D. Richardson(eds).IRL press.Oxford unvi.press.pp.235-253.
- 16-Hammer,K.A.; Carson C.F.&T.V.Riley.(1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract.J.ofAppl.Microbiol.86:985-990.
- 17-Steel,R.G.D. and J.H. Torrie .(1960). Principles and Procedures of statistics,McGraw Hill Book company,Inc.Newyork,Toronto,London. pp.481.
- 18-Knoblock,K.; Weis N &H.Weigand.(1986).Mechanism of antimicrobial activity of essential oils. Plantamedica.52:p.556.
- 19--Onyeagba,R.A.;Ugbogu,O.C.;C.U.Okeke& O.Iroakasi.(2004).Studies on the antimicrobial effects of Garlic (*Allium sativum* Linn) ,Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and Lime (*Citrus aurantifolia* Linn) Afr.J.Biotechnol.3(10):552-554.