The Antibiotic Effecacy 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 للبنات/قسم علوم الحياة

الخلاصة

تم دراسة تأثير المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل **Ginger (*Zingiber officinale*)** تجاه اربعة انواع من البكتريا ***Escherichia coli , Pseudomonas spp , Salmonella typhi , Staphylococcus aureus*** باستخدام طريقة انتشار االقرص **(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 (.19و20.67و21.67) مليمتر للتراكيز (200و300و400)ملغم/مليلتر على التوالي في حين كانت بكتريا ***S. aureus*** هي الاكثر مقاومة للمستخلص الكحولي اذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (10.33و12و12.67) مليمتر للتراكيز (200و300و400) ملغم/مليلتر على التوالي . كما أظهرت النتائج ان التركيز المثبط الادنى **(MIC)** للاجناس البكتيرية الاربعة *(E.coli, Pseudomonas Spp.,S.aureus S.typhi ,)* هو (0.6و1.25و2.5 و5) مايكروغرام/ مليلتر على التوالي فيما كان التركيز القاتل الادنى **(MBC)** للاجناس البكتيرية اعلاه هو (1.25و 2.5و5و 10) مايكرو لتر / مليلترعلى 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 averageof 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 المجهريةمثل *Escherichia coli , Staphylococcus aureus* تؤدي الي تلف الغذاء وهي واحدة من أهم مشاكل الصناعات الغذائية. لذا يجب استخدام المواد الحافظة الكيميائية للحفاظ على الصناعات الغذائية من التلف بالاحياء المجهرية. وفي الوقت الحاضر بدء الاهتمام بأستخدام المضادات الحياتية الطبيعية مثل المستخلصات النباتية والتوابل التي بالاضافة الى اضفائها الطعم والرائحة المميزين للطعام فهي تعد كمضاد حيوي وكمضاد للسموم[1و2و3]

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[4و5و6] وبصورة عامة فأن 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 لاهميتها وفائدتها بدأ أستعمالها في الوقت الحاضر في الدول النامية يتزايد أيضا [5].

ومن هذه التوابل التى لها فعالية طبية هو نبات الزنجبيل (*Zingiber officinale*) Ginger , 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 ا 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 [1و2و4و5و6و8و9].

لذا اجريت هذة الدراسة لاول 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 التخافيف 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 (Nutrient Agar (NA 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 الادنى 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 all*.,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 (Soxholet Extractor) اذ وضع 50 غرام من مسحوق جذور النبات الجافة في دورق زجاجي واضيف له 250 مليلتر من الكحول المثيلي 70% بنسبة(5:1 وزن/حجم)، واستمرت عملية الاستخلاص لمدة 6 ساعات وبدرجة حرارة (60-70) م° ثم رشح المستخلص في قمع بوخنر تحت التفريغ واستخدم ورق ترشيح (Whattman No.1)وبعد الترشيح وزع المستخلص على اطباق ووضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة(37)م° لتركيز المستخلص ثم حفظ المستخلص في الثلاجة لحين الاستخدام .

3- العزلات البكتيرية :-

تم الحصول على العزلات البكترية *Escherichia coli , Pseudomonas spp , Salmonella typhi , Staphylococcus aureus* من مختبر الصحة المركزي التابع لوزارة الصحة حيث تم عزل الانواع البكترية 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 ×10خلية 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 حاوعلى 10 مليلتر وسط(NB) المعقم. وحضن مدة 24ساعة بدرجة حرارة (37) م°. وبعد انتهاء مدة الحضن عملت سلسلة من التخافيف 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 20و30و40% وذلك بأذابة (200و300و400) ملغم من المستخلص الجاف في 1مليلتر من المذيب العضوي داي مثيل سلفو كسايد Dimethyl sulphoxide (DMSO)بتركيز10%.

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

ج-عقمت اقراص الورق النشاف بقطر 6 ملميتر 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 20و30و40% 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 الحياتي اموكسيسلين Amoxicillin كمقارنة موجبة (positive control) وتركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة للسماح المستخلص بالانتشار ثم حضنت الاطباق بدرجة 37مْ ولمدة 24 ساعة, ثم قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمترووقورنت 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 التخافيف النصفية الدقيقة MICRO BROTH DILUTION METHOD اعتماد على الصادق (2005) [11] و (1989) Warnock [15] :

ا- حضرت سلسلة من التخافيف النصفية للمستخلص الكحولي بتراكيز (20و10و5و2.5و1.25و0.6و0.3) مايكرو غرام / مل بأنابيب اختبار معقمة حاوية على وسط مرق مولر هنتون Muller Hinton Broth (MHB).

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

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

د-أخذ 100 مايكرليترمن كل تركيز ووضعت في طبق زجاجي معقم وصب الوسط الصلب المعقم والمبرد (45-50) مْ ومزج جيدا لكي يتجانس الوسط الغذائي مع المزروع الذي يحتوي على (المستخلص النباتي والبكتريا وMHB) وتركت الاطباق لتتصلب ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ 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 التعشية بثلاث مكررات واستعمل اختبار دنكن متعدد الحدود بمستوى 0.05 لمقارنة المتوسطات الحسابية[17].

النتائج و المناقشة :-

اظهرت النتائج وجود تأثير مثبط للمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل ضد الاجناس البكتيرية المدروسة ففي التركيز 20%كانت اقطار هالة التثبيط (19.33,12.33,11.33,10.33)مليمتر للانواع *E.coli , Pseudomonasn spp. , S.typhi , S.aureus*على التوالي, اما اقطار هالة التثبيط في التركيز 30% كانت(20.67,12.67,13.67,12)مليمتر لنفس الانواع اما اقطار هالة التثبيط للتركيز 40% فقد كانت (21.67,14.67,14.33,12.67) مليمتر لنفس الانواع على التوالي, اذ لوحظ زيادة قطر هالة التثبيط بزيادة تركيز المسخلص ,بينما كان قطر هالة التثبيط للمضاد الحيويAmoxicilin هي(30 ,30 ,15)مليمتر للانواع *S .typhi* و*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(p <0.05,0.01) بالنسبة للتراكيز الثلاثة(200و300و400)ملغم/مليلتر كما ظهر وجود فرق معنوي بين العزلة *E.coli* وبقية العزلات *Pseudomonas spp.* و*S .typhi* و *S .aureus* للتراكيز الثلاثة (200و300و400)ملغم/مليلتر اذ كانت هي الاكثر حساسية اما العزلة *S.aureus* فكانت الاكثر مقاومة للتراكيز الثلاثة للمستخلص النباتي .

جدول رقم (1)معدلات اقطار هالة التثبيط بالمليمترللانواع البكتيرية الاربعة

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

الحروف المختلفة عموديا(a,b,c) يعني وجود فرق معنوي متناقص 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 *E.coli , Pseudomonas spp. ,S. typhi ,S. aureus*. فقد وجد ان قيمة (MIC)للانواع البكتيرية هو (0.6 و2.5و1.25 و5) مايكرو غرام /مليلتر للانواع *E.coli , Pseudomonas spp. ,S. typhi ,S. aureus* على التوالي في حين كان التركيز القاتل الادنى (MBC) لبكتريا *E.coli* هو (1.25) و (5) لبكتريا *Pseudomonas spp.* ولل *S. typhi* هو(2.5) ولبكتريا *S. aureus* هو(10) مايكرو غرام /مليلتر. جدول رقم (2).

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

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

اظهرت النتائج ان للمستخلص الكحولي الميثانولي لجذور نبات الزنجبيل تاثيرا مثبطا تجاه نمو الانواع البكتيرية المختبرة اذ يتميز المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل بأحتوائه على(zingiberene , farnescene) كـأكبر مكونين رئيسين فضلا عن احتوائه على مركبات (curcumene , bisabolene, geranionl , phellandrene , gingerone) -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 السايتوبلازمي متمثلة بعملية بناء البروتين وبالتالي تثبيط وايقاف هذه العملية وكذلك اعاقة 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 ماذكره[4] والذي اوضح من خلال دراسته ان للمستخلص الكحولي لجذور الزنجبيل تأثيرا مثبطا لنمو بعض الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصيغة جرام وبعض

الفطريات في حين جاءت بعض النتائج مخالفة لما ذكره[1] والذي اوضح من خلال دراسته ان للزيت الطيار لجذور نبات الزنجبيل تأثيرا مثبطا للبكتريا الموجبة لصبغة جرام في حين لم يكن لـه تـأثيرا مثبطـا للبكتيريـا السـالبة لصبغة جرا م قيد الاختبـار, في حين جاءت بعض الدراسات موافقة لما جاء في هذه الدراسة اذ اوضح كلا من[8,5] ان للمستخلص المـائي لجـذور نبـات الزنجبيـل تـأثير مثبطا للبكتريا السالبة لصبغة جرام قيد الدراسـة ***Escherichia coli , Pseudomonas spp Salmonella typhi*** و يعزى هذا التـاثيرالى قـدرة المسـتخلص النبـاتي الـى تثبيط تضـاعف بكتريـا القولـون *E.coli* اذ تخمـر هـذه البكتريـا الكاربوهايـدرات غيـر المهضومة مما يؤدي الى امتلائها بالغازات ،هذا مما يجعلها تتاثر بالمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل كمضاد لها.[4]
في حين لم تتفق الدراسة مع ما جاء في دارسة [2] الذي اوضح في دراسته ان المستخلص الكحـولي ليس لـه تـأثير مثبط في حين كان للزيت الطيار تأثير مثبط على البكتريا السالبة لصبغة جرام . كما ان الدراسة لم تتفق مع مـا جـاء فـي دراسـة[19] الـذي اوضـح في دراسته انه لم يكن للمستخلص المائي والكحولي لجذور نبات الزنجبيل تأثيرا مثبطا للبكتيريا الموجبة والسـالبة لصبغة جرام قيد الدراسة***Escherichia coli , Pseudomonas spp , Salmonella typhi , Staphylococcus aureus***. وهذا يعود الـى 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 ربمـا سيساعد علـى الحمايـة مـن مختلـف 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 (*Pentaclethora 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 *Eschrichia 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,ص181 .

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-الصـادق ,سرى مؤيد عبد المجيد .(2005). تاثير بعض المركبـات الفعالـة المستخلصـة مـن حشيشـة الليمـون *Cymbopogon citrates* والزعتر *Thymus vulgaris* في انواع المبيضات والبكتريا المعزولة من افواه الاطفال المصـابين بـداء السـلاق الفمي Oral Thrush رسالة ماجستير مقدمة الى كلية العلوم للبنات-جامعة بغداد . صفحة112 .

12-Holt,J.G.,Kreig,N.R.,Sneath.P,H.A.,Stanley,J.T.and Williams,S.T.(1994).Berges manual of determination bacteriology,9th 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.25,8th 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.