دراسة التأثير التثبيطي لبعض المستخلصات المائية ضد الفطر *Geotrichum candidum*

هديل احمد العامري صالح عيسى محمد

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2006/2/5 , تاريخ القبول 2006/5/8)

الملخص

تم دراسة تأثير المستخلصات المائية لكل من النباتات الطبية (الثوم، الزعتر، الحبة الـسوداء، الاس والنعناع) بصورة منفردة وممزوجة مع الثوم ضد الفطر *Geotrichum candidum* المعزول من عينـات القشع والنامي على وسط Sabouroud's Glucose Agar (SGA) عند الاس الهيدروجيني(5.6) ودرجـة حرارة (28)^{o}م، حيث اظهرت المستخلصات النباتية منفردة تأثيراً تثبيطياً متفاوتاً لنمو الفطر وكان احـسن تركيز مثبط لها هو التركيز (25) ملغم/سم^{3} اذ ثبط نمو الفطر بنسبة (91.4%) لمستخلص الحبة الـسوداء يليه مستخلص الزعتر اذ ثبط نمو الفطر بنسبة (88.5%) ثم مستخلص النعناع حيث كانت نسبة التثبـيط المئوية (86.2%) وثبط مستخلص الثوم نمو الفطر بنسبة (80.5%) واخيراً ثـبط مـستخلص الاس نمـو الفطر بنسبة (73.8%)، في حين اعطى مستخلص الاس ممزوجاً مع الثوم تأثيراً تثبيطياً كلياً(100%) لنمو الفطر عند التركيزين (25 و20) ملغم/سم^{3} ثم مستخلص النعناع ممزوجاً مع الثـوم عنـد التركيـز (25) ملغم/سم^{3} في حين اعطى مستخلص الزعتر ممزوجاً مع الثـوم تثبيطـاً لنمـو الفطـر بنـسبة(89.1%) ومستخلص الحبة السوداء المائي ممزوجاً مع الثوم بنسبة (65.2%) عند التركيز(25) ملغم/سم^{3}.

Study of Inhibitory Effect of Aqueous Extracts of Some Medicinal Plants Against *Geotrichum candidum*

Hadeel A. Al-Ameri **Saleh E. Mohammed**
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

Study of inhibitory effect of aqueous extracts of (garlic, thyme, black seed, myrtle and peppermint) used separately or mixed with garlic against *G. candidum* isolated from sputum samples and growing on Sabouraud's Glucose Agar (SGA) medium at pH 5.6 and 28°C showed that all aqueous extracts had variable inhibitory effects against the fungus growth. It was found that the extract of black seed alone had the highest activity inhibiting the fungal growth. The inhibition percentage was (91.4%) obtained at concentration of (25) mg/ml, followed by the extract of thyme (88.5%) at concentration of (25) mg/ml, followed by the extract of peppermint (86.5%) at concentration (25) mg/ml and then the extract of garlic with (80.5%) at concentration (25) mg/ml; finally the extract of myrtle inhibited that fungus growth (73.8%) at concentration (25) mg/ml.

It was also shown, by study of the effect of combination between garlic extract and other extracts, that there were different degrees of inhibition of fungal growth; The combination of garlic and myrtle extract showed complete growth inhibition of *G. candidum* at concentration of (25) mg/ml and (20) mg/ml, followed by the combination of garlic and peppermint extract at concentration (25) mg/ml, followed by the combination between garlic and thyme extract (89.1%) at concentration (25) mg/ml, then the combination between garlic and black seed extract (65.2%) at concentration (25) mg/ml.

المقدمة

ينتشر الفطر *G. candidum* بصورة واسعة في الماء والهواء والتربة ويلـوث منتجـات الالبـان (Bouakline et al., 2000)، ويسبب داء الشعريات الأرضية Geotrichosis على الانسان والحيوان وهو من الأمراض الانتهازية الواسعة الانتشار في العالم (Wainstein et al., 1995)، يصيب الانسان ويسبب التهابات الفم والمهبل والالتهابات الجادية والتهابات القناة الهضمية ويمكن ان تتواجد مسببات المرض في القناة الهضمية دون ظهور اعراض مرضية ويعتبر الفطر بهذه الحالة ضمن الفلورا الطبيعيـة وسـرعان مايكون ممرضاً انتهازياً في الاشخاص المثبطين مناعياً ويسبب المرض التهابات اللـوزتين والقـصبات الهوائية والرئة (Moss and McQuown, 1969).

بات معلوماً ما للفطريات من اضرار على الصحة العامة، وعلى الـرغم مـن وجـود مـضادات كيمياوية مؤثرة عليها, إلا أن مقاومة الفطريات المرضية لمضاداتها الكيمياوية أصبحت مشكلة حقيقية في العالم (Foster, 2000)، فاتجهت أنظار العالم إلى استخدام النباتات الطبيـة بوصـفها مـضاداتٍ لهـذه

الفطريات المرضية لعدم احداثها أضراراً جانبية عند استخدامها بالجرع المحـددة (Chun et al., 2001)، أما باستخلاص المواد الفعالة من كل نبات لوحده أو باستخلاصها من أكثر من نوع نباتي بعـد مزجهـا بأوزان محددة (Xia and Kong, 1998)، اذ يحتوي الثوم على زيت أساسي ذي رائحة نفاذة ومركبـات كبريتية عضوية وكلايكوسيدات Glucosides وعفصيات Tannins وقلويات Alkaloides وصـابونيات Saponins (الصراف، 1982). الا ان الزعتر يحتوي لى زيت طيار ذي رائحة عطريـة (Roberts et al., 1998) وعلى مواد فينولية أهمها Thymolو Carvacrol التي يعزى إليها المفعول الطبـي ومـواد راتنجية Resins وعفصيات Tannins وفلافونات (Zheng and Wang, 2001).

اما الحبة السوداء فيحتوي الزيت الطيار فيها على مادة النجلون Nigellone التـي يعـزى إليهـا المفعول الطبي وعلى Nigellicine وNigelline وأحماض دهنية (Nergiz and Otles, 1993). في حين ان اوراق الاس تحتوي على زيت أساسي هو Myrtol وعلى العفصيات Tannins ومـواد مـرة Bitter وراتنجات Resins والميرستين Myricetin (مجيد ومحمود، 1988).

ويحتوي النعناع على زيت طيار يعرف بزيت النعناع Peppermint oil له رائحة مميزة وطعم حاد والذي يتكون من مركبي المنثول Menthol والمنثون Menthone فضلاً عن تربينات أخرى مثل بينـين Pinene وفيلاندرين Phelleudrene وقليل من الراتنجات Resins وتانينـات Tannins ومـواد دباغيـة وعناصر مرة (أبو زيد، 1988).

المواد وطرائق البحث

عزل الفطر *G. candidum* من عينات القشع sputum المأخوذة مـن المرضـى المحـالين مـن العيادات الاستشارية إلى مختبر الفطريات في مستشفى الرازي العام بالموصل والذين يعانون من سـعال مصحوب بقشع مستمر لمدة طويلة وغير مستجيب للعلاج؛ حيث تم تعقيم تجويف الفم والغرغرة بمحلـول ملحي في الصباح الباكر وأخذت العينة وزرعت علـى وسـط Sabouroud's Glucose Agar (SGA) وحضنت تحت درجة 30 ^{0}م لمدة اسبوعين فحصت بعدها المستعمرات الفطرية النامية مظهرياً من حيـث اللون والشكل والقوام (De Hoog and Guarro, 1995).

تـم اختيـار خمـسة نباتـات طبيـة شـائعة الاسـتعمال فـي التـداوي بالأعـشاب فضلاً عن وجودها في البيئة العراقية وهي الثوم (*Allium sativum*) Garlic والزعتر (*Thymus vulgaris*) Thyme والحبـة الـسوداء (*Nigella sativa*) Black cumin والاس (*Myrtus communis*) Myrtle والنعناع (*Mentha longifolia*) Peppermint. جمعت النباتات الطبية (الثـوم والحبـة الـسوداء) مـن الأسواق المحلية أما الاس والنعناع فقد تم جمعه من حدائق الجامعة في حين جمع الزعتـر مـن منطقـة القوش في محافظة نينوى، جفف نباتا النعناع والزعتر طبيعياً وحفظت النماذج بعد الجفاف التام في أكياس بلاستيكية لحين الاستعمال، وقد استخدم الثوم والاس طريين.

حضرت المستخلصات المائية للنباتات المستخدمة في الدراسة حسب طريقة (Riose et al., 1987) وذلك بمزج 40 غم من النموذج النباتي مع 160 سم^3 من الماء المقطر باستثناء نبات النعناع حيث مـزج 40 غم منه مع 200 سم^3 من الماء المقطر، سحق النموذج بواسطة جفنة خزفية ثم هرس باستخدام جهـاز الخلاط الكهربائي تحت التبريد، ترك المزيج بدرجة 4 ^{0}م لمدة 24 ساعة لغرض النقع، ورشح بعد ذلـك خلال عدة طبقات من الشاش، ثم عرض الراشح إلى الطرد المركزي بقوة 3000 د/د لمـدة 10 دقـائق ورشح مرة أخرى بواسطة قمع بوخنر باستخدام ورق ترشيح (Whatman No. 2) تحت التفريغ وبذلك تم الحصول على المستخلص المائي الخام لكل نبات، جفف المستخلص الناتج بالتبريد تحت الضغط المخلخل بجهاز Lyophilizer تحت درجة حرارة -50 ^{0}م حفظت العينات في عبوات بلاستيكية محكمة الغلق تحت التجميد لحين الاستعمال. اما المستخلصات المائية للنباتات الطبية ممزوجة مع الثوم فقد حضرت بمـزج 20 غم من الثوم مع 20 غم من كل نبات طبي وأضيف إلى 160 سم^3 من الماء المقطر باسـتثناء الثـوم والنعناع حيث أضيف إليه 200 سم^3 من الماء المقطر، واكملت طريقة التحضير كما فـي اعـلاه. وتـم تحضير تركيز قياسي من المستخلص بنسبة 200 ملغم/سم^3 وعقم باستخدام مرشـح سـايتز Seitz filters الحاوي على مرشح غشائي بقطر 0.22 مايكرون تحت التفريغ وعد هذا التركيز القياسي مصدراً لتحضير التخافيف المستخدمة في الدراسة (النعمان، 1998).

واجري اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية منفردة وممزوجة مع الثوم عليه وذلك بإضافة أحجام محددة من كل مستخلص معقم إلى أحجام محددة من الوسط الغذائي SGA المعقم قبل تصلبه فـي قنانٍ زجاجية، وبعد رجها جيداً تم الحصول على التراكيز(5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25) ملغم/سم^3 ثم صـبت في ثلاثة أطباق بتري بقطر (9) سم وبعد تصلب الوسط أخذ قرص من حافة المستعمرة الفطريـة بعمـر اسبوع بواسطة ثاقب فلين Cork porer بقطر 0.5 سم ووضع في مركز الطبق في ظـروف معقمـة ثـم حضنت الأطباق بوضع مقلوب في درجة حرارة 28 ^{0}م في حاضنة لمدة اسبوع، أخذت النتـائج بحـساب متوسط قياس قطرين متعامدين كل مستعمرة فطرية وكانت كل معاملة بثلاثة مكررات كل مكرر طبـق واحد.

النتائج والمناقشة

تاثير المستخلصات النباتية المنفردة

اظهرت جميع مستخلصات النباتات الطبية المدروسة منفردة وبكافة التراكيز تاثيراً تثبيطيـاً لنمـو الفطر *G. candidum* وبدرجات متفاوتة وبفروقات معنوية مختلفة جدول 1 حيث تفوق مستخلص الحبـة السوداء على باقي المستخلصات اذ بلغت نسبة التثبيط المئوية (91.4%) يليه مـستخلص نبـات الزعتـر بنسبة (88.5%) ثم مستخلص نبات النعناع بنسبة (82.9%) ومستخلص نبات الثوم بنسبة (80.5%) واخيراً مستخلص نبات الآس بنسبة (73.8%) عند التركيز (25) ملغم/سم^3 في حين اختلفت هـذه النـسب عنـد

التركيز (20) ملغم/سم^3 حيث بلغت (86.2%، 83.4%، 81%، 77.7% و 59.5%) لمستخلصات النعناع، الحبة السوداء، الزعتر، الثوم والآس على التوالي، اما عند التركيز (15) ملغم/سم^3 فبلغت النسب المئوية (80%، 73,4%، 72.4% 67.7% و 42.1%) على التوالي لمستخلصات الحبة السوداء، الثوم، النعناع، الزعتر والآس في حين بلغت النسب المئوية عند التركيز (10) ملغم/سم^3 (77.1%، 62.4%، 57.7%، 56% و 28.1%) للمستخلصات الحبة السوداء، النعناع، الثوم، الزعتر والآس، واخيراً بلغت النسب المئوية للتثبيط (56.7%، 42.4%، 37.7%، 34.1% و 22.4%) على التوالي للمستخلصات الحبة السوداء، الزعتر، الثوم، النعناع والآس عند التركيز (10) ملغم/سم^3.

ان اختلاف نسب التثبيط باختلاف المستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة بثبوت التراكيز المستخدمة يعود الى اختلاف المواد الفعالة التي تسبب تثبيط نمو الفطر حيث تعود فعالية الثوم ضد الاحياء المجهرية الى ان انزيم Allinase يعمل على الحامض الاميني Allinin الموجود في الثوم لانتاج المضاد الحيوي لنمو الجراثيم وهو الاليسين Allicin، كذلك لوجود Diallyl disulfide (Dreidger 1996,). وقد وجد Panizzi واخرون (1993) بان زيت الزعتر الاساسي له تأثير مثبط لنمو الفطريات، وكذلك وجد محمد (1999) ان مستخلص الزعتر المائي ثبط نمو و الفطر *Aspergillus flavus* بنسبة (88%) عند التركيز (20) ملغم/سم^3 كذلك ان زيت الزعتر يؤثر على نمو الفطريات الجلدية. كما اثبتت النعمان (1998) عدم وجود تأثير لمستخلص الزعتر المائي على عدة انواع جرثومية منها *Proteus vulgaris* و *Strept. pyogenes* وقد يعود ذلك لاختلاف تركيب الخلية البكتيرية عن الخلية الفطرية ويعود سبب التثبيط الى احتواء الزعتر على الفينولات كالثيمول Thymol والكارفاكرول Carvacrol المثبطة او القاتلة للاحياء المجهرية (Isman et al., 2001)، في حين وجد Hanafy و Hatime (1991) ان لمستخلص الحبة السوداء فعالية تثبيطية ضد الفطر *Candida albicans* بتركيز (25-400) مايكروغرام/قرص. واثبت الجنابي (1996) ان مستخلص الاس المائي ثبط نمو و الفطريات *T. mentagrophytes*، *T. rubrum*، *T. tonsurance*، *E. floccosum*، ويعود سبب التثبيط الى احتواء مستخلص الاس على المواد الفعالة Kaempferol، Myricetin، Aglycone وكلايكوسيدات ومواد فينولية لا سيما مجموعة Myrtucommulones A and B الفينولية. في حين بين EL-Kady واخرون (1993) ان مستخلص النعناع المائي اظهر تأثيراً تثبيطياً عالياً ضد الفطريات *Microsporum canis*، *T. simmii* و *Candida albicans* والبكتيريا *E. coli*، *Salmonella paratyphi*، *Staph. ureus*، *Prot. vulgaris*، *B. cereus* ويرجع التأثير المثبط لمستخلص النعناع الى احتوائه على المنثول Menthol والمنثون Menthone ذات الفعالية التثبيطية للاحياء المجهرية.

الجدول 1 : التأثير المثبط للمستخلصات النباتية المائية على الفطر *G. candidum* عند درجة حرارة 28 ^{o} م لمدة اسبوع على وسط SGA.

نوع المستخلص	التركيز ملغم/سم^3	متوسط أقطار المستعمرات الفطرية (سم)*	النسبة المئوية للتثبيط**
الثوم	5	4.2	37.7 س
	10	2.9	57.7 ل
	15	1.8	73.4 زح
	20	1.5	77.7 و
	25	1.3	80.5 هـ
الزعتر	5	4.0	42.4 ن
	10	3.0	56 م
	15	2.2	67.7 ط
	20	1.3	81 هـ
	25	0.8	88.5 ب
الحبة السوداء	5	3.0	56.7 م
	10	1.6	77.1 و
	15	1.4	80 هـ
	20	1.1	83.4 د
	25	0.6	91.4 أ
الآس	5	5.4	22.4 ف
	10	5.0	28.1 ص
	15	4.1	42.1 م
	20	2.8	59.5 ك
	25	1.8	73.8 ز
النعناع	5	4.6	34.1 ع
	10	2.6	62.4 ي
	15	1.9	72.4 ح
	20	1.8	74.2 ز
	25	0.8	86.2 ج
المقارنة	0	7.0	0 ش

* قيم المتوسطات تمثل متوسط ثلاث قراءات.

** القيم التي تشترك بحرف أبجدي واحد او اكثر ليس بينها فرق معنوي باستخدام اختبـار دنكـن عنـد مستوى احتمال 0.05.

تاثير المستخلصات النباتية ممزوجة مع الثوم

اظهر مستخلص الآس ممزوجاً مع الثوم تاثيراً تثبيطياً عالياً فاق جميع المستخلصات الاخرى حيث كانت النسب المئوية للتثبيط (100%، 100%، 97.7%، 88.1% و 77.4%) على التوالي للتراكيـز (25، 20، 15، 10 و 5) ملغم/سم^3 في حين كانت النسب المئوية للتثبيط لمستخلص النعناع ممزوجاً مع الثـوم (100%، 67.1%، 47.7%، 43.4% و 25.2%) ولمستخلص الزعتـر ممزوجـاً مـع الثـوم (89.1%، 86.7%، 69.5%، 46.5% و 13.4%) عند نفس التراكيز اعلاه، في حين كانت النسب المئوية لمستخلص الحبة السوداء ممزوجة مع الثوم اقلها تاثيراً وبلغت (65.2%، 33.4، 24.8%) عند التراكيـز (25، 20 و 15) ملغم/سم^3 وحصلت زيادة في النمو الشعاعي للفطر عند التركيزين (10 و 5) ملغم/سـم^3 ادت الـى زيادة نمو الفطر اكثر من معاملة المقارنة ويعود السبب الى ان المستخلص خام يحتوي علـى مركبـات كثيرة سببت استطالة خيوط الفطر *G. candidum* الا ان الخيوط الفطرية كانت رفيعة بالاضافة الى كون المستعمرات الفطرية كانت رقيقة مما يدل على قلة عدد السبورات النابتة لتكوين الخيوط الفطرية او ربما لقلة التفرع وتكوين الكونيدات في هذين التركيزين.

وجد AL-Tikrity (1997) ان فعالية مستخلص الاس والخرنـوب ضـد الفطريـات *T. rubrum* و *Candida albicans* اعلى من فعالية مستخلص كل نبات منفرداً وكـذلك وجـد العنـزي (2001) ان مستخلص الثوم والاس ادى الـى تثبـيط الفطـر *A. fumigatus* و*T. mentagrophytes* تثبيطـاً تامـاً (100%). كما وجد محمد (1999) ان المستخلص المائي للثوم والنعناع ذو فعالية تثبيطية عاليـة ضـد الفطر *A. flavus* وكان لزيت الثوم والنعناع فعالية في تقليل سـمية الافلاتوكـسين B_1 فـي الفئـران المختبرة،وكذلك كان لزيت النعناع والزعتر فعالية عالية مضادة لنمو الفطـر *A. flavus* وتقليـل سـمية الافلاتوكسين، كما وجد العنزي (2001) ان مستخلص الثوم والزعتر المائي ثـبط نمـو الفطريـات *T. mentagrophytes* و *A. fumigatus* تثبيطاً تاماً (100)% في حين كان تأثيره على الفطر *A. niger* مثبطاً بنسبة (72%).

الجدول 2 : تأثير مزج مستخلص الثوم والمستخلصات النباتية المائية الأخرى على الفطر *G. candidum* عند درجة حرارة 28 ^{o} م لمدة اسبوع على وسط SGA

نوع المستخلص	التركيز ملغم/سم^3	متوسط أقطار المستعمرات الفطرية (سم)*	النسبة المئوية للتثبيط**
الثوم والزعتر	5	6.1	13.4 م
	10	3.7	46.2 ط
	15	2.1	69.5 و
	20	0.9	86.7 د
	25	0.7	89.1 جـ
الثوم والحبة السوداء	5	7.5	---
	10	7.3	---
	15	5.2	24.8 ل
	20	4.6	33.4 ك
	25	2.4	65.2 ح
الثوم والاس	5	2.1	71.4هـ
	10	0.8	88.1 ج د
	15	0.2	97.7 ب
	20	0	100 أ
	25	0	100 أ
الثوم والنعناع	5	5.2	25.2 ل
	10	3.9	43.4 ي
	15	3.6	47.7 ط
	20	2.3	67.1 ز
	25	0	100 أ
المقارنة	0	7.0	0 ن

* قيم المتوسطات تمثل متوسط ثلاث قراءات

** القيم التي تشترك بحرف أبجدي واحد او اكثر ليس بينها فرق معنوي باستخدام اختبار دنكـن عنـد مستوى احتمال 0.05.

--- قيم المتوسطات فاقت متوسطات المقارنة

المصادر

ابو زيد، الشحات نصر, 1988. النباتات العطرية ومنتجاتها الزراعية والدوائية، الطبعة الاولـى، الـدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، 473 ص.

الجنابي، علي عبد الحسين, 1996. تأثير بعض المستخلصات النباتيـة علـى نمـو بعـض الفطريـات الممرضة لجلد الانسان، رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، العراق.

الصراف، عباس محمد جواد, 1982. دراسة بعض الصفات الكيميائية والدوائية لبصلة الثـوم، رسـالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، العراق.

العنزي، مشعل علي محمود, 2001. دراسة التآلف بين مستخلص الثوم ومستخلصات نباتات طبية ضـد بعض الفطريات الممرضة للانسان، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

مجيد، سامي هاشم ومهند جميل محمود, 1988. النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحـث العلمي، الطبعة الاولى، دار الثورة للصحافة والنشر، بغداد، 274ص.

محمد، صالح عيسى, 1999. تأثير بعض المستخلصات النباتيـة علـى الفطريـات المنتجـة لـسموم الافلاتوكسين، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.

النعمان، اديبة يونس شريف حمو, 1998. التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية

AL-Tikrity, T.A., 1997. Evaluation of antifungal activity of some plants extracts against dermal fungi. M.Sc. thesis, College of Medicine, Tikrity univ. Iraq.

Bouakline, A., Lacroix, C., Roux, N., Gangneux, J.P. and Deronin, F., 2000. Fungal contamination of food in hematology units. J. Clin Microbiol. 38: pp.4272-4273.

Chun, H., Jun, W.J., shin, D.H., Hong, B.S., Cho, H.Y. and yang, H.C., 2001. Purification and characterization of anti-complementary polysaccharide from leaves of Thymus vulgaris L., Chem. Pharm. Bull, 49(6): pp.762-764.

De Hoog, G.S. and Guarro, J., 1995. Atlas of clinical fungi, Universitat Rovira Ivirgili, reus, Spain. 720 p.

Dreidger, S., 1996. Ode to garlic : the stinky rose can be good for you. Maclean's, 109: pp.62-64.

El-Kady, I.A., AL-Maraghy, S.S. and Mohammed, E.M., 1993. Antibacterial and antidermatophyte activities of some essential oils from spices, Qutar Univ. Sci. J. 13(1): pp.63-69.

Hanafy, M.S. and Hatime, M.E., 1991. Studies on the antimicrobial activity of Nigella sativa seed (black cumin), J. Ethno. Pharmacol. 34(213): pp.275-278.

Isman, M.B., Wan, A.J. and Passreiter, C.M., 2001. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, Spodoptera Litura, Fitoterapia, 72(1): pp.65-68.

Moss, E.S. and McQuown, A.L., 1969. Atlas of Medical Mycology, 3rd ed., the Williams and Wilkins co. Baltimore, U.S.A. pp.163-164.

Nergiz, C. and Otles, S., 1993. Chemical composition of Nigella sativa seeds, J. Food. Chem. Essex. 48(3): pp.252-261.

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I., 1993.Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae, J. Ethnopharmacol, 39(3): pp.167-170.

Ramanoelina, A.R., Terrom, G.P., Bianchini, J.P. and Goulanges, P., 1987. Antibacterial action of essential oils extracted from Medagascar plants, Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 53(1): pp.217-226.

Riose, J.L., Recio, M.C. and Villar, A., 1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean Area. J. Ethnopharmacol. 21: pp.139-152.

Wainstein, M.A., Graham, R.C. and Resnick, M.I., 1995. Predisposing factors of systemic fungal infections of the genitourinary tract. J. Urol. 154: pp.160-163.

Xia, Q. and Kong, J., 1998. Methods used in ethnomedicine studies in applied ethnobotony, proceeding of the National Training work shop on applied Ethnobotany in china.

Zheng, W. and Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, J. Agric Food chem., 49(11): pp.5165-5170.