دراسة التركيب الكيميائي والتضاد البكتيري للزيوت العطرية المستخلصة من قشور ثمار الحمضيات

رضوان بدر الدين و بسام العقلة و لينة الأمير

قسم التقانات الصناعية والغذائية ــ الهيئة العامة للتقانة الحيوية ــ سورية

تاريخ الإيداع 2012/07/04

قبل للنشر في 2012/11/05

الملخص

استُخلصت الزيوت العطرية بطريقة الجرف ببخار الماء من قشور ثمار ستة أنواع من الحمضيات هي الليمون الحامض (*Citrus limon*) والبرتقال (*C. sinensis*) والكريفون (*C. paradisi*) والبوملي (*C. maxima*) واليوسفي (*C. reticulata*) والنارنج (*C. aurantium*). حُدّدت مكونات الزيوت العطرية المستخلصة من الأنواع السابقة باستخدام جهاز الاستشراب بالطور الغازي موصولاً بمطياف الكتلة (GC-MS)، وقد بلغ عدد المركبات 45 مركباً تفاوتت أعدادها ونسبها بحسب نوع الزيت العطري وكان المركب المشترك بين الجميع وبأعلى نسبة مئوية هو **limonene**. استخدمت الزيوت العطرية المستخلصة في تحديد الفعالية المضادة للبكتريا عبر تطبيقها على خمسة أنواع موجبة غرام (*Staphylococcus aureus*، *S. epidermidis*، *S. xylosus*، *S. lentus* و*Bacillus subtilis*) وتسعة أنواع سالبة غرام (*Klebsiella pneumoniae*، *Enterocobacter cloacae*، *Citrobacter freundii*، *Proteus mirabilis*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Morganella morganii*، *Hafnia alvei*، *Salmonella* sp.) بتراكيز راوحت بين 4 و100 µl زيت /1 مل وسط Mueller Hinton Broth (MHB).

دلّت النتائج على أن الزيت العطري المستخلص من قشور الليمون الحامض أكثر فعالية كمضاد للبكتريا من بقية الزيوت الأخرى، كما وجد أيضاً أن البكتريا موجبة غرام هي عموماً الأكثر حساسية لهذه الزيوت العطرية مقارنة بالبكتريا سالبة غرام، في حين وجد أن النوع *P. aeruginosa* هو الأكثر حساسية عموماً بين البكتريا سالبة غرام.

الكلمات المفتاحية: الحمضيات، الزيوت العطرية، الاستشراب بالطور الغازي موصولاً بمطياف الكتلة، الفعالية المضادة للبكتريا

Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils extracted from citrus fruit peels

R. Badr Al-Deen; B. Al-Oklah and L. Al-Amir
National Commission for Biotecnology, Damascus, Syria

Received 04/07/2012
Accepted 05/11/2012

ABSTRACT

Essential oils from peels of 6 citrus species were extracted. The species were lemon (*Citrus limon*), orange (*C. sinensis*), grapefruit (*C. paradisi*), pomelo (*C. maxima*), mandarin (*C. reticulata*) and bitter lemon (*C. aurantium*) using hydro-distillation (Clevenger type). The chemical composition of the extracted essential oils was identified using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The total number of identified compounds was 45. The components and their percentage varied according to the citrus species. The most common component with the highest percentage was limonene. Antimicrobial activity of the oil extracts was tested against five Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus, S. epidermidis, S. xylosus, S. lentus* and *Bacillus subtilis*) and nine Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae, Enterocobacter cloacae, Citrobacter freundii, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Morganella morganii, Hafnia alvei* and *Salmonella* sp.).

Concentration of oils applied ranged from 4 to 100 µl/ml of Meuller Hinton Broth. Oil extracted from *Citrus limon* peel showed the highest antimicrobial activity. In general Gram-positive bacteria were more sensitive to the oil extracts tested than Gram-negative bacteria, and *P. aeruginosa* was the most sensitive within the Gram-negative group.

Key words: Citrus, essential oils, GC-MS, antimicrobial activity.

المقدمة

الزيوت العطرية (أو الطيارة) هي سوائل زيتية عطرية يمكن الحصول عليها من مختلف الأجزاء النباتية (الأزهار، البراعم، الأوراق، الأغصان، اللحاء، الخشب، الجذور، البذور والثمار)، ويمكن الحصول عليها بالضغط أو الاستخلاص لكن طريقة التقطير بالبخار هي الأكثر شيوعاً في الإنتاج التجاري (Van de Braak and Leijten, 1999). ومن حيث التركيب الكيميائي فإن الزيوت العطرية مركبات معقدة تتضمن العديد من المكونات المفردة التي تشتق كيميائياً من التربينات (terpenes) والتي تمثل مركباتها المؤكسجة (Prabuseenivasan *et al*., 2006)، وهي سوائل كارهة للماء (Lee *et al*., 2007).

يتضمن الجنس *Citrus* ما يقارب 16 نوعاً من أشجار الحمضيات تنتمي للعائلة *Rutaceae* وتزرع بصورة أساسية في المناطق المدارية وشبه المدارية.

يمثل إنتاج الزيوت العطرية من الحمضيات الجزء الأكبر من إنتاج العالم من الزيوت العطرية (Tirado *et al*., 1995). وتعطي الزيوت العطرية المنتجة من قبل العديد من الأنواع النباتية فعالية حيوية، لامتلاكها خواصَّ مضادة للبكتريا، وخواصَّ مضادة للأكسدة وتؤدي دور منظمات حيوية (Kırbaşlar *et al*., 2009).

مع أن الخواص المضادة للبكتريا للزيوت العطرية قد درست بصورة موسعة، إلا أن الخواص المضادة للبكتريا للزيوت العطرية المستخلصة من الحمضيات لا تزال غير مكتشفة بشكل جيد (Fisher and Phillips, 2008).

وجد Kırbaşlar وآخرون (2009) أن الزيوت العطرية لقشور الليمون تتركب بصورة أساسية من الفحوم الهيدروجينية أحادية التربين (monoterpene hydrocarbons) بنسبة 89.9 %، وفحوم الهيدروجينية التربين المضاعف مرة ونصف (sesquiterpene hydrocarbons) بنسبة 3.3%، والمركبات المؤكسجة بنسبة 5.1%، وأخيراً المركبات الإستيرية بنسبة 1.8%. في حين تتركب الزيوت العطرية لقشور الكريفون من 96.4% فحوم الهيدروجينية أحادية التربين، و0.8 % فحوم الهيدروجينية التربين المضاعف مرة ونصف و1.2% مركبات مؤكسجة.

تبدي العديد من الزيوت العطرية فعالية مضادة للبكتريا، وكذلك فعالية مضادة للفطريات والفيروسات، والبكتريا والحشرات (Prabuseenivasan *et al*., 2006)، والزيوت العطرية المعروفة بفعاليتها الحيوية كمبيد أو طارد للحشرات هي زيوت البرتقال والقرنفل والزعتر والنعناع والليمون الحامض والقرفة (Isman and Machial, 2006).

يوجد العديد من مضادات البكتريا في كثير من الأنسجة النباتية والحيوانية، وقد قيَّمت العديد من الدراسات الفعالية المضادة للبكتريا في المستخلصات النباتية، بما فيها السمسم

Sesamum radiatum (Shittu *et al.*, 2007) و*Allium cepa* البصل (Agatemor, 2009) والزيتون وتوت العليق الأسود وزيوت البرتقال العطرية (George *et al.*, 2009).

أُثبتت الفعالية المضادة للبكتريا للزيوت العطرية المستخلصة من الحمضيات ومركباتها المفردة (Viuda-Martos *et al.*, 2008). وفيما يتعلق بتثبيط أعداد البكتريا الممرضة المنقولة عن طريق الغذاء أو تخفيضها مثل *Salmonella* spp. و *Escherichia coli* O157:H7 و*Listeria monocytogenes* باستخدام الزيوت العطرية المستخلصة من الحمضيات فإن البحوث التي أُجريت نادرة (Espina *et al.*, 2011). وجد أن الزيت العطري المستخلص من اليوسفي قد أظهر فعالية ضد ثلاثة أنواع موجبة غرام (*S. aureus*، *L. monocytogenes*، *Enterococcus faecium*)، وثلاثة أنواع سالبة غرام (*Salmonella entritidis*، *E. coli* O157:H7، *P.aeruginosa*) (Espina *et al.*, 2011).

في الدراسة التي قام بها Siddique وآخرون (2011) على عدة أنواع من البكتريا موجبة وسالبة غرام، وجد أن الزيت العطري المستخلص من قشور النارنج ذو فعالية أعلى ضد البكتريا موجبة غرام (*Bacillus subtilis* ATCC 6633، *Klebsella pneumoniae*، *Salmonella typhimurium*، *P. aeruginosa*، *P. fluorescens*، *S. aureus*) وأن أكبر منطقة تثبيط كانت ضد بكتريا *B. subtilis* ATCC 6633 و*S. aureus*، وأن الأنواع سلبية الغرام (*S. typhimurium*، *K. pneumoniae*، *E. coli*) كانت مقاومة لهذا الزيت العطري.

وجد Celikel و Kavas (2008) أن الزيت العطري المستخلص من قشور البرتقال بتركيز 20 µg قد أعطى منطقة تثبيط قطرها 14 و17 و18 مم بالنسبة إلى بكتريا *E. coli* و*L. monocytogenes* و*S. aureus* على الترتيب.

مواد وطرائق البحث

أجري هذا البحث في مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية-قسم التقانات الصناعية والغذائية بدمشق. إذْ جُمعتْ عينات ثمار الحمضيات (الليمون الحامض والبرتقال والكريفون والبوملي واليوسفي والنارنج) من السوق المحلية في مدينة دمشق. غسلت الثمار وجففت ثم بُشِرَت طبقة الفلافيدو (flavedo) بوساطة مبشرة يدوية ونقلت القشور المبشورة إلى جهاز استخلاص الزيوت العطرية بالجرف ببخار الماء (نموذج Clevenger)، وفُصل الزيت العطري عن الماء بالتثقيل بسرعة 6000 دورة/دقيقة مدة 20 دقيقة. جمعت طبقة الزيت العلوية بالماصة وجففت باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية وحفظت في المجمدة في الدرجة -21° س إلى حين التحليل بجهاز GC-MS (Kırbaşlar *et al.*, 2009).

تم الحصول على السلالات البكتيرية وهي خمسة أنواع موجبة غرام (*Staphylococcus aureus*، *S. epidermidis*، *S. xylosus*، *S. lentus* و *Bacillus subtilis*) وتسعة أنواع سالبة غرام (*Klebsiella pneumoniae*، *Enterocobacter cloacae*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Citrobacter freundii*، *Proteus mirabilis*، *Morganella morganii*، *Hafnia alvei*، *Salmonella* sp.) من مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية-قسم التقانات الصناعية والغذائية.

تحديد التركيب الكيميائي للزيوت العطرية باستخدام جهاز GC-MS

حُدّد التركيب الكيميائي للزيوت العطرية باستخدام جهاز GC (Agilent نموذج 7890A) المزود بمطياف الكتلة MS (Agilent نموذج 5975C) وحاقن آلي (Agilent نموذج 7683B) باستخدام مكتبتي NIST وWiley وباستخدام المحاليل العيارية الآتية: (D-limonene, β-myrcene, β-linalool, α-terpineol, o-cymene, α-pinene, β-pinene) من شركة Sigma-aldrich. استخدم عمود شعري من النوع DB-1 (30 م × 0.25 مم × 0.20 µm) وفق البرنامج الحراري: 60° س مدة 4 دقائق ثم 60←64° س بمعدل 1° س/د ثم 64 ← 155° س بمعدل 2.5° س/د ثم 155 ← 250° س بمعدل 5° س/د. واستخدم الهليوم كغاز حامل بمعدل تدفق 1 مل/دقيقة. وضبطت درجة حرارة الحاقن عند 250 ° س، كمية العينة المحقونة 1 ميكرولتر بمعدل تجزئة 1: 80 (Espina *et al*., 2011). وكانت شروط التحليل بطيف الكتلة كما يأتي: درجة حرارة مصدر الأيونات 230° س، درجة حرارة رباعي الأقطاب 150° س، مجال المسح 30-450، طاقة مصدر الأيونات 70 إلكترون فولت.

دراسة التأثير المضاد للبكتريا للزيوت العطرية المستخلصة

حُضّرت تراكيز مختلفة من الزيوت العطرية راوحت بين 4 و100 µl/ml (4، 10، 20، 30، 40، 50 و100 µl/ml) بمزج الكمية المحددة من كل زيت عطري مع وسط MHB مع إضافة Tween 20 بنسبة 0.001 % لتسهيل انتشار الزيت في الوسط.

حُضّر معلق لكل نوع من أنواع البكتريا المدروسة، وهي خمسة أنواع موجبة غرام (*Staphylococcus aureus*، *S. epidermidis*، *S. xylosus*، *S. lentus* و *Bacillus subtilis*) وتسعة أنواع سالبة غرام (*Klebsiella pneumoniae*، *Enterocobacter cloacae*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Citrobacter freundii*، *Proteus mirabilis*، *Morganella morgani*، *Hafnia alvei*، *Salmonella sp.*) بتركيز 1×10^5 خلية مكونة مستعمرة/مل مقدرة بطريقة أطباق التمديد، وأضيف 10 ميكرولتر منه إلى مزيج MHB والزيت العطري حجمه النهائي 2 مل لتحديد التركيز الأدنى المثبط (MIC). حضن المزيج بحرارة 37° س مدة 24 ساعة. جرى التحقق من

التأثير المثبط بأخذ 10 ميكرولترات من المزيج المحضن وزرعها على أطباق الآغار المغذي وتحضينها مدة 24 ساعة بحرارة 37° س وملاحظة النمو.

النتائج والمناقشة

1- التركيب الكيميائي للزيوت العطرية المدروسة

تبيّن بنتيجة التحليل باستخدام جهاز GC-MS احتواء مجموعة الزيوت العطرية قيد الدراسة على 45 مركباً في أنواع الحمضيات الستة المدروسة، وقد حُسبَ أيضاً مجموع نسب الفحوم الهيدروجينية أحادية التربين، والفحوم الهيدروجينية مضاعفة التربين والمركبات الأكسجينية (الإسترات، الألدهيدات والكحولات)؛ وهي مبينة في الجدول (1)، في حين يبيّن الجدول (2) الشظايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركبات المدروسة مقارنة بالشظايا العشرة الأكثر وفرة الموجودة في مكتبة الجهاز.

الجدول (1) النسب المئوية للمركبات الكيميائية للزيوت العطرية المستخلصة من قشور الحمضيات

م	اسم المركب	الليمون%	البرتقال%	الكريفون%	البوملي%	اليوسفي%	النارنج%
1	Limonene	62.159	95.263	93.41	96.276	86.764	95.209
2	γ-Terpinene	12.963	0.108	0.056	-	7.821	-
3	β-Pinene	6.958	0.071	0.064	0.272	0.498	0.302
4	Citral	2.744	0.134	0.048	-	-	-
5	β-Citral	2.018	0.108	0.049	-	-	0.06
6	β-Myrcene	1.531	1.849	2.111	1.75	1.992	2.083
7	(±)-Lavadulol acetate	1.432	-	0.132	-	-	0.044
8	α-Pinene	1.427	0.564	0.621	0.522	1.07	0.591
9	β-Bisabolene	1.348	-	-	-	-	-
10	β-Phellandrene	1.076	0.596	0.632	0.183	0.108	0.158
11	cis-Geraniol	0.928	-	0.11	0.125	-	-
12	α-Bergamotene	0.889	-	-	-	-	-
13	Terpinolene	0.653	-	-	-	0.412	-
14	Caryophyllene	0.438	-	0.618	0.233	-	0.11
15	O-Cymene	0.416	-	-	-	0.228	-
16	α-Phellandrene	0.379	-	-	-	0.236	-
17	α-Terpineol	0.366	-	-	-	0.032	0.071
18	Isoterpinolene	0.330	-	-	-	0.183	-
19	Terpinene-4-ol	0.258	-	0.06	-	0.076	-
20	β-Linalool	0.208	0.341	0.129	-	0.132	0.238
21	Isopulegol	0.184	-	0.129	-	-	-
22	Eremophilene	0.167	0.320	-	-	-	-
23	Octanal	0.130	0.296	0.303	0.453	0.107	0.107
24	β-Ocimene	0.128	-	0.371	-	0.155	0.334
25	Nonanal	0.108	-	0.08	-	-	-
26	cis-α-Bisabolene	0.092	-	-	-	-	-
27	1R- α-Pinene	0.088	-	-	-	-	-

تتمة الجدول (1)...

-	-	-	-	-	0.087	β-Farnesene	**28**
-	-	-	-	-	0.087	γ-Elemene	**29**
0.239	0.117	-	0.621	0.351	0.075	Decanal	**30**
-	-	-	-	-	0.07	α-Santalol	**31**
-	-	-	-	-	0.062	2-Pinene-4-ol	**32**
-	-	-	-	-	0.049	α-Bisabolol	**33**
-	-	-	-	-	0.046	Berbenol	**34**
-	-	-	-	-	0.04	Camphene	**35**
-	-	-	-	-	0.037	(Z)-β-Farnesene	**36**
-	-	-	-	-	0.028	Acoradien	**37**
0.075	-	-	-	-	-	cis-Linalooloxide	**38**
0.124	-	-	-	-	-	Pergamiol	**39**
-	0.049	-	-	-	-	Thymol	**40**
0.196	-	-	0.07	-	-	β-Cubebene	**41**
-	-	-	0.071	-	-	α-Caryophyllene	**42**
0.057	-	0.185	0.085	-	-	Germacrene D	**43**
-	-	-	0.047	-	-	α-Cubebene	**44**
-	-	-	0.182	-	-	(+)-δ-Cadinene	**45**
98.594	99.123	98.82	96.633	97.855	86.693	**مجموع الفحوم الهيدروجينية أحادية التربين**	
0.521	0.344	0.601	1.705	0.916	4.628	**مجموع الفحوم الهيدروجينية مضاعفة التربين**	
0.883	0.513	0.578	1.661	1.23	8.678	**مجموع المركبات الأوكسجينية**	
0.044	0	0	0.132	0	1.432	**مجموع الإسترات**	
0.406	0.224	0.453	1.101	0.889	5.075	**مجموع الألدهيدات**	
0.433	0.289	0.125	0.428	0.341	2.171	**مجموع الكحولات**	

الجدول (2) الشظايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركب المدروس+الشظية العائدة للوزن الجزيئي (إذا لم تكن ضمن الشظايا الأكثر وفرة) مقارنة بالشظايا الأكثر وفرة للمركب نفسه من مكتبة الجهاز+الشظية العائدة للوزن الجزيئي (إذا لم تكن ضمن الشظايا الأكثر وفرة) مع درجة التطابق %

المركب	الشظايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركب المدروس +الشظية العائدة للوزن الجزيئي للمركب **M** أو **M+1** (إذا لم تكن ضمن الشظايا الأكثر وفرة)*	الشظايا العشر الأكثر وفرة للمركب نفسه من مكتبة الجهاز +الشظية العائدة للوزن الجزيئي للمركب **M** أو **M+1** (إذا لم تكن ضمن الشظايا الأكثر وفرة)*	درجة التطابق %
Limonene	-107-92-121-94-79-67-93-68 136-91	-27-79-53-41-39-93-67-68 *(136)-77-94	19.2
γ-Terpinene	-79-290-121-77-136-91-93 43-94-105	-39-79-92-121-136-77-91-93 43-41	39.8
β-Pinene	-94-121-41-77-79-69-91-93 (136)-80-92	-27-79-77-91-39-69-41-93 (136)-53-92	14.2
Citral	-91-109-83-39-94-84-41-69 (152)-137-67	-67-83-53-94-39-84-41-69 (152)-91-109	54.0
β-Citral	-39-134-84-94-119-91-41-69 (152)-79-109	-81-95-109-94-39-84-41-69 (152)-82-83	21.7
β-Myrcene	-67-92-39-77-79-91-41-69-93 (136)-94	-67-79-53-27-39-69-93-41 (136)-91-77	19.7

تتمة الجدول (2)...

15.6	-136-67-121-68-41-43-93-69 (196)-91-80	-79-67-91-68-43-41-93-69 (196)-80-121	(±)-Lavadulol acetate
12.1	-121-39-41-79-77-91-92-93 (136)-105-27	-94-105-121-79-77-92-91-93 (136)-80-41	α-Pinene
23.3	-109-79-204-67-94-41-93-69 (204)-161-107	-109-91-67-94-79-41-69-93 (204)-119-107	β-Bisabolene
18.5	-80-41-94-79-136-91-77-93 39-92	-92-41-94-136-79-77-91-93 69-80	β-Phellandrene
11.4	-29-27-67-39-68-93-41-69 (154)-84-53	-91-79-57-43-41-93-32-69-44 (154)-85	cis-Geraniol
50.9	-77-55-107-69-91-119-41-93 (204)-105-79	-79-105-41-107-69-91-93-119 (204)-55-77	α-Bergamotene
28.2	-105-77-79-136-91-121-93 107-41-39	-105-77-79-91-136-121-93 44-141-107	Terpinolene
24.0	-105-69-79-41-91-133-93 (204)-77-120-107	-105-44-41-79-69-133-91-93 (204)-107-119	Caryophyllene
23	-77-41-117-22-91-134-119 115-39-65	-115-44-120-117-91-134-119 103-65-77	O-Cymene
15.3	-27-41-136-39-92-77-91-93 51-65	-44-94-136-79-92-77-91-93 39-41	α-Phellandrene
42.6	-68-67-81-67-136-121-93-59 (154)-43-79	-68-67-81-44-36-121-59-93 (154) -43-79	α-Terpineol
29.3	-105-77-79-136-91-121-93 107-41-39	-105-77-79-91-136-121-93 44-141-107	Isoterpinolene
69.3	-68-69-55-86-111-43-93-71 (154)-67-136	-136-77-43-91-44-111-93-71 (154)-121-41	Terpinene-4-ol
51.9	-121-80-69-41-43-55-93-71 (154)-39-67	-91-80-55-43-69-41-44-71-93 (154)-32	β-Linalool
26.8	-93-68-71-55-81-69-67-41 (154)-39-121	-32-67-121-55-95-41-44-69 (154)-56-81	Isopulegol
16.9	-107-91-105-79-93-41-161 135-119-204	-93-79-119-105-32-91-161-44 (204)-133-107	Eremophilene
23.0	-55-27-56-57-29-41-44-43 (128)-84-42	-84-56-55-41-43-57-91-93-44 (128)-77	Octanal
12.0	-39-92-41-77-80-79-91-93 (136)-105-53	-41-32-92-80-77-79-44-91-93 (136)-105	β-Ocimene
61.8	-27-55-44-56-29-43-57-41 (142)-82-70	-68-70-32-43-55-56-41-57-44 (142)—98	Nonanal
18.2	-77-39-39-79-67-91-41-93 (204)-29-53-27	-91-43-41-119-57-32-93-44 (204)-67-105	cis-α-Bisabolene
15.7	-105-53-79-41-77-92-91-93 (136)-80-121	-41-80-77-32-79-92-91-44-93 (136)-105	1R- α-Pinene
23.2	-55-53-133-79-67-93-69-41 (204)-81-91	-133-43-57-41-93-69-32-44 (204)-81-55	β-Farnesene
21.8	-53-55-67-107-41-93-121 (204)-79-91-105	-105-41-91-107-93-32-121-44 (204)-43-79	γ-Elemene

تتمة الجدول (2)...

46.2	-56-70-29-44-55-57-41-43 (156)-71-68	-70-82-71-55-41-32-43-57-44 (156)-56	Decanal
3.38	-77-91-122-43-79-41-93-94 67-55	-91-55-41-71-94-57-43-32-44 105	α-Santalol
20.4	-81-55-43-109-39-59-94-41 (105)-67-91	-91-109-94-41-67-81-32-44 (152)-69-82	2-Pinene-4-ol
23.7	-55-93-67-109-119-69-41-43 (222)-71-204	-119-41-69-71-57-43-32-44 (222)-55-93	α-Bisabolol
7.59	-81-55-43-109-39-59-94-41 (152)-67-91	-81-109-43-67-91-41-32-44 (152)-79-94	Berbenol
25.4	-77-67-41-39-91-79-121-93 (136)-27-107	-67-107-91-79-32-121-93-44 (136)-77-41	Camphene
20.4	-91-81-79-67-39-93-69-41 (204)-133-53	-91-55-93-43-41-57-69-32-44 (204)-79	(Z)-β-Farnesene
9.05	-41-79-147-105-93-121-119 (204)-107-55-91	-69-93-41-43-57-119-32-44 (204)-91-105	Acoradien
12.1	-93-111-41-68-94-55-43-59 (170)-81-67	-93-111-67-94-43-59-32-44 (170)-68-55	cis-Linalooloxide
6.42	-55-68-121-80-69-41-43-93 (196)-79-71	-32-80-55-43-69-41-71-44-93 (196)-91	Pergamiol
15.1	-117-136-115-39-91-150-135 (150)-41-51-77	-136-115-91-32-150-44-135 (150)-41-77-57	Thymol
24.0	-120-79-119-105-41-91-161 (204)-81-39-77	-93-119-41-91-105-32-61-44 (204)-69-43	β-Cubebene
41.6	-69-92-43-55-121-80-41-93 (204)-79-107	-121-91-43-57-41-93-32-44 (204)-80-55	α-Caryophyllene
26.3	-81-79-119-41-91-105-161 (204)-27-77-93	-41-43-91-105-57-32-161-144 (204)-81-119	Germacrene D
34.4	-92-91-41-93-161-105-119 (204)-77-55-81	-41-93-32-91-161-105-119-44 (204)-92-81	α-Cubebene
20.5	-204-134-91-41-105-119-161 93-77-81	-32-204-134-105-119-44-161 41-81-91	(+)-δ-Cadinene

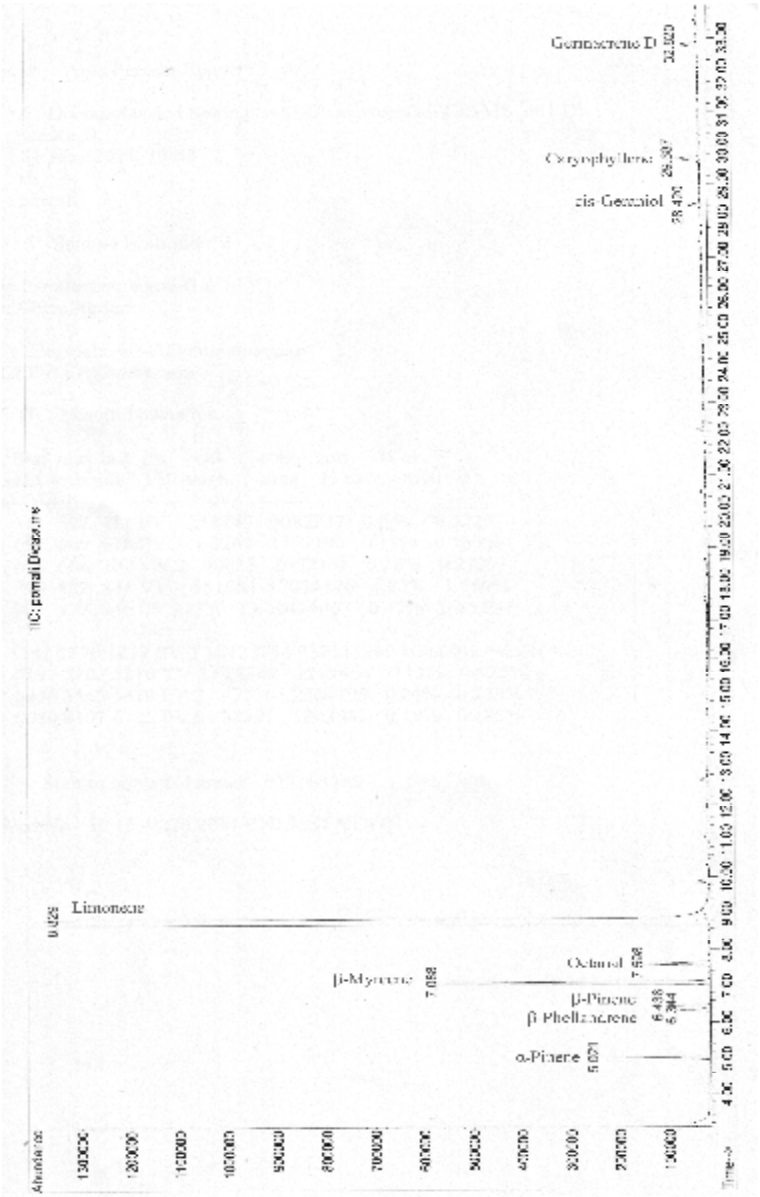
* الوزن الجزيئي للمركب موضوع بين قوسين () إذا لم يكن ضمن الشظايا العشر الأكثر وفرة.

يلاحظ من الجدول السابق أن الليمونين هو المركب السائد في الزيوت المدروسة جميعها، وقد بلغت نسبته 62.159، 95.263، 93.410، 96.276، 86.764 و95.209 % في زيوت الليمون، والبرتقال، والكريفون، والبوملي، واليوسفي والنارنج على الترتيب. وكانت هذه النتائج قريبة من النتائج التي سجلها Kırbaşlar and Kırbaşlar (2009) اللذان وجدا أن نسبة الليمونين كانت 61.8، 92.5 و94.1 % في الليمون، والكريفون والنارنج على الترتيب. في حين كانت نسبة الليمونين في زيت البرتقال أعلى مما سجله Moufida و Marzouk (2003) اللذان وجدا أن نسبة الليمونين في زيت البرتقال 88.21%.

كما يلاحظ احتواء الزيت المستخلص من قشور الليمون على أعلى نسبة من مركبات α-Pinene و β-Phellandrene و β-Pinene، γ-Terpinene و β-Citral، Citral و xis-Geraniol التي بلغت 1.427 و 1.076 و 6.958 و 12.963 و 2.018 و 2.744 و 0.928 % على الترتيب، وينفرد الزيت السابق باحتوائه على مركبات α-Bergamotene و β-Bisabolene بنسبة 0.889 و 1.348% على الترتيب، فضلاً عن آثار من مركبات Camphene و Berbenol و 2-Pinene-4-ol و Acoradien و (Z)-β-Farnesene و β-Farnesene، γ-Elemene و cis-α-Bisabolene و α-Santalol و α-Bisabolol و 1R- α-Pinene و (بنسب أقل من 0.1 %).

احتوى الزيت العطري المستخلص من قشور البرتقال على أعلى نسبة من مركب β-Linalool (0.341%) وهي أعلى من النسبة التي سجلها Moufida و Marzouk(2003) التي كانت 0.02%، وكذلك على أعلى نسبة من مركب Eremophilene (0.320 %) مقارنة بزيت الليمون (0.167%)، كما احتوى على أعلى نسبة -بعد الليمون- من مركبي β-Citral و Citral (0.108 و 0.134% على الترتيب) مقارنة بالزيت المستخلص من الكريفون، وهي أعلى من النسبة التي سجلها Moufida و Marzouk (2003) اللذان وجدا أن نسبة المركب Citral في كل من زيتي البرتقال والليمون كانت 0.02 % لكل منهما. كما احتوى زيت قشور البرتقال نسبة 1.849% من مركب β-Myrcene وهي ثاني أعلى نسبة بعد مركب الليمونين الذي بلغت نسبته 95.26% (كما ذكر سابقاً)، ونسباً متوسطةً من مركبات α-Pinene و β-Phellandrene و Octanal و γ-Terpinene و Decanal (0.564، 0.596 و 0.296 و 0.108 و 0.351 % على الترتيب). وآثاراً من مركب β-Pinene (0.071%).

أمَّا الزيت العطري المستخلص من قشور الكريفون فقد احتوى على أعلى نسبة من مركبات β-Myrcene و β-Ocimene و Decanal و Caryophyllene (2.111 و 0.371 و 0.621 و 0.618%). كما انفرد باحتوائه على مركب δ-(+)-Cadinene بنسبة 0.182 % وعلى آثار من مركبي α-Caryophyllene و α-Cubebene (0.071 و 0.047% على الترتيب). كما احتوى على نسب متوسطة من مركبات α-Pinene و β-Phellandrene و Octanal و β-Linalool و Isopulegol و (±) - Lavadulol acetate و cis - Geraniol (0.621 و 0.632 و 0.303 و 0.129 و 0.129 و 0.132 و 0.110 % على الترتيب)، وعلى آثار من مركبات β-Pinene و γ-Terpinene و Terpinene-4-ol و β-Cubebene و β-Citral، Citral و Germacrene D (بنسب أقل من 0.1%).



الشكل (1) المخطط الكروماتوغرافي للزيت العطري المستخلص من قشور ثمار البوملي

تميّز الزيت العطري المستخلص من قشور البوملي (شكل1) باحتوائه على أعلى نسبة من limonene و Germacrene D و Octanal (96.276 و0.185 و0.453% على الترتيب) مقارنة ببقية الزيوت العطرية المدروسة، وكانت نسبة مركب β-Myrcene (1.750%) وهي أعلى نسبة بعد limonene. كما احتوى على نسب متوسطة من مركبات β-Phellandrene و β-Pinene و cis-Geraniol و Caryophyllene و α-Pinene (0.183 و0.272 و0.125 و0.233 و0.522% على الترتيب)، كما تميّز بخلوه من مركب β-Linalool.

شكل مركب γ-Terpinene (7.821%) أعلى نسبة بعد الليمونين (86.674 %) في الزيت العطري المستخلص من قشور اليوسفي، وقد تميّز باحتوائه على نسبة مرتفعة من مركبات α-Phellandrene و β–Pinene و α-Pinene و β-Myrcene و O-Cymene (0.236 و0.498 و1.070 و1.992 و0.228% على الترتيب) ويأتي في المرتبة الثانية بعد limonene في نسبة المركبات الخمسة السابقة، كما احتوى على آثار من مركبات Terpinene-4-ol و α-Terpineol وانفرد الزيت السابق باحتوائه على نسبة ضئيلة من مركب Thymol (0.049%)، وكذلك انفرد مع الليمون باحتوائه على مركبي Isoterpinolene و Terpinolene بنسب 0.183 و0.412% على الترتيب، في حين احتوى أدنى نسبة من مركب β-Phellandrene (0.108%) واشترك مع النارنج في أدنى نسبة من مركب Octanal (0.107%).

تميّز الزيت العطري المستخلص من النارنج باحتوائه على نسبة عالية من مركب β-Myrcene (2.083%) وهي أعلى نسبة بعد limonene الذي شكل (95.204%)، وقد كانت نسبة مركب limonene قريبة جداً مما سجله عودة (2011) الذي وجد أن هذه النسبة قد راوحت بين 96.28 و97.24% في ثلاث عينات مختبرة. كما احتوى الزيت السابق على أعلى نسبة من مركب β-Cubebene (0.196 %) مقارنة بتركيزه في الكريفون، وانفرد باحتوائه على مركبي cis-Linalooloxide و Pergamiol بنسبة 0.075 و0.124 % على الترتيب. كما تميّز باحتوائه على نسبة جيدة من مركب β-Linalool و Decanal (بنسبة 0.238 و0.239% على الترتيب). كما احتوى على نسب متوسطة من مركبات α-Pinene و β-Phellandrene و β-Pinene و Octanal و β-Ocimene و Caryophyllene (0.591 و0.158 و0.302 و0.107 و0.334 و0.110% على الترتيب)، وقد كانت نسبة مركب α-Pinene قريبة مما سجله عودة (2011) إذْ وجد أن نسبته قد راوحت بين 0.83 و0.66%، في حين كانت نسبة β-Pinene أعلى قليلاً مما ذكره عودة (2011) الذي وجد أن نسبته قد راوحت بين 0.10 و0.16%. كما احتوى الزيت العطري المستخلص من قشور النارنج على آثار من مركبات α-Terpineol و β-Citral، (±)-Lavadulol acetate و Germacrene D.

2-دراسة الخصائص المضادة للبكتريا للزيوت العطرية

حُضّرتْ سبعة تراكيز (4 و10 و20 و30 و40 و50 و100 µl زيت/1 مل MHB) من الزيوت العطرية الستة بمزج الحجم المحدد من كل زيت مع وسط MHB بإضافة نسبة 0.001% من Tween 20 لعمل مستحلب للزيوت العطرية في الوسط. درس التأثير المضاد للبكتريا في 5 أنواع من البكتريا موجبة غرام و9 أنواع من البكتريا سالبة غرام. وحُدّد التركيز الأدنى المثبط للبكتريا (جدول2).

الجدول (2) التركيز الأدنى المثبط للبكتريا باستخدام الزيوت العطرية المستخلصة من قشور ستة أنواع من الحمضيات

البكتريا	التركيز الأدنى المثبط للنمو (µl/ml)					
	الليمون	البرتقال	الكريفون	البوملي	اليوسفي	النارنج
S. xylosus	50	50	50	100	100	50
S. lentus	10	100	50	100	100	50
S. aureus	30	100	100	100	100	100
S. epidermidis	30	50	40	40	50	50
B. subtilis	4	10	40	50	10	50
C. freundii	4	100	40	100	100	100
M. morganii	100	100	100	100	100	100
Enter. cloacae	50	100 <	100	100 <	100 <	100 <
K. pneumoniae	50	100	100	100 <	100 <	100 <
Salmonella sp.	100	100	100	100 <	100 <	100 <
P. mirabilis	100	100	100 <	100 <	100 <	100 <
E. coli	100	100 <	100 <	100 <	100	100
H. alvei	50	100	100	100	100	100 <
P. aeruginosa	10	40	40	40	40	40

يلاحظ من الجدول (2) أن البكتريا موجبة غرام أكثر تأثراً بالزيوت العطرية من البكتريا سالبة غرام عموماً، وقد وافقت هذه النتيجة ما توصل إليه Smith-Palmer وآخرون (2001) الذين وجدوا أن بعض البكتريا موجبة غرام أكثر حساسية للزيوت العطرية من البكتريا سالبة غرام، واقترحوا أن السبب هو عدم نفاذية الجدار الخارجي المحيط بالبكتريا سالبة غرام. تعدُّ الطبيعة الكارهة للماء لمكونات الزيوت العطرية مهمة جداً، وهي تسمح لها بالتجمع على الغشاء السيتوبلازمي للخلية البكتيرية محدثة تأثيرات سمية فيها (Sikkema *et al.*, 1994)، حيث تهيج الغشاء السيتوبلازمي للخلية مؤدية إلى النفاذية المتزايدة للبروتونات والأيونات وفي النهاية موت الخلية (Sikkema *et al.*, 1995).

وجد أن الزيت العطري المستخلص من قشور الليمون هو الأكثر فعالية عموماً، كما يلاحظ أن تأثير البوملي واليوسفي كان متقارباً، وكذلك البرتقال والكريفون وذلك بالنسبة إلى أنواع البكتريا المدروسة جميعها.

وعموماً يلاحظ أن تأثير الزيوت العطرية المدروسة متقارب بالنسبة إلى الأنواع سالبة غرام جميعها ما عدا النوع *P. aeruginosa* الذي كان أكثر تحسساً.

يلاحظ أن أعلى فعالية مضادة للبكتريا بالنسبة إلى بكتريا *S. xylosus* قد سجلت في زيوت الليمون والبرتقال والكريفون والنارنج وجميعها تحتوي أعلى نسبة من المركبات الأوكسجينية (8.678، 1.230، 1.661 و0.883% على الترتيب) في حين وجد أن أدنى فعالية كانت للبوملي واليوسفي، ويرجع السبب في ذلك إلى انخفاض محتواهما من المركبات الأوكسجينية (0.578 و0.513 % على الترتيب)، وقد ذكر Lihandra (2007) أن المركبات الأوكسجينية لها خواص مضادة للبكتريا والفطريات.

بالنسبة إلى بكتريا *S. lentus* يلاحظ أن أعلى فعالية مضادة للبكتريا قد سجلت في الليمون وبدرجة أقل بالنسبة إلى الكريفون والنارنج، وأن أضعف فعالية كانت في كل من البرتقال والبوملي واليوسفي؛ وهذا يتوافق مع محتوى هذه الزيوت من الكحولات، إذْ كان مجموع نسب الكحولات 2.171، 0.428 و0.433 % في زيوت الليمون، والكريفون والنارنج على الترتيب، وقد توافقت هذه النتائج مع ما ذكره Lihandra (2007) الذي وجد أن المركبات الأوكسجينية لها خواص مضادة للبكتريا والفطريات.

لوحظ أن أعلى فعالية مضادة لبكتريا *S. aureus* كانت في الزيت المستخلص من الليمون وهي أقل في بقية الزيوت، ويرجع السبب إلى احتواء الزيت المستخلص من الليمون على نسبة عالية من مركبي α-Pinene وβ-Pinene (مجموع نسبهما 8.385 %) مقابل ما مجموعه 0.635 و0.685 و0.794 و1.568 و0.893% في زيوت البرتقال والكريفون والبوملي واليوسفي والنارنج على الترتيب، وتتوافق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Aristides وآخرون (2007) الذين وجدوا أن المركبين السابقين لهما تأثير مثبط في عدة سلالات من بكتريا *S. aureus*.

وجد Sonboli وآخرون (2005) أن لمركب limonene تأثيراً مضاداً لبكتريا *S. epidermidis* ، و*P. aeruginosa* وهذا ما يفسر التركيز المنخفض نسبياً الكافي لتثبيط هذين النوعين للزيوت العطرية المدروسة جميعها لأنها تحتوي جميعاً على نسبة مرتفعة من limonene (من 62.159-96.276 %). كذلك يلاحظ أن التأثير المضاد لبكتريا *S. epidermidis* كان أعلى في الزيت المستخلص من قشور الليمون ثم الكريفون والبوملي، وبدرجة أقل في بقية الزيوت؛ ويتوافق ذلك مع محتوى هذه الزيوت من مركبي cis-Geraniol وCaryophyellen إذْ كان مجموع نسبها 1.366 و0.728 و0.358% في

زيوت الليمون والكريفون والبوملي على الترتيب مقابل ما مجموعه 0.11% في زيت النارنج، وخلو كل من زيتي البرتقال واليوسفي من هذين المركبين.

كما يلاحظ أن تأثير الزيت العطري المستخلص من قشور الليمون ضد بكتريا *P. aeruginosa* كان الأعلى في حين كان متساوياً في بقية الزيوت العطرية؛ وهذا يتوافق مع محتواها من المركبات الأكسجينية، إذ كان مجموع هذه المركبات في الزيت المستخلص من قشور الليمون 2.171%، وكان متقارباً في بقية الزيوت (0.341 و0.428 و0.125 و0.289 و0.433%) في الزيوت العطرية المستخلصة من قشور البرتقال والكريفون والبوملي واليوسفي والنارنج على الترتيب.

بالنسبة إلى بكتريا *B. subtilis* يلاحظ أن الفعالية المضادة للبكتريا تتناسب مع مجموع نسب مركبات α-Pinene وβ-Pinene وα-Phellandrene وβ-Phellandrene وCitral وβ-Citral إذْ كان مجموع نسبها 14.602 و1.473 و1.912% في الزيوت العطرية المستخلصة من قشور الليمون والبرتقال واليوسفي على الترتيب، مقابل ما مجموعه 1.414 و0.977 و1.111% في الكريفون والبوملي والنارنج على الترتيب.

يمكن ملاحظة الفعالية العالية للزيت العطري المستخلص من قشور الليمون ضد بكتريا *C. freundii*، يليه الزيت العطري المستخلص من قشور الكريفون، في حين تلاحظ أقل فعالية في الزيوت المستخلصة من قشور البرتقال والبوملي واليوسفي والنارنج، وهذا يتوافق مع محتوى هذه الزيوت العطرية من الفحوم الهيدروجينية مضاعفة التربين (4.628 % في زيت الليمون و1.075% في زيت الكريفون؛ 0.916 و0.601 و0.344 و0.521% في زيوت البرتقال، البوملي، اليوسفي والنارنج على الترتيب).

كانت الفعالية المضادة لبكتريا *M. morganii* متساوية في الزيوت العطرية المدروسة جميعها. ربما يرجع السبب في ذلك إلى محتواها المتقارب من مركب limonene الذي يمثل النسبة العليا في الزيوت السابقة كلّها.

وجد أن أعلى فعالية مضادة لبكتريا *Enterobacter cloacae* كانت للزيت العطري المستخلص من الليمون ثم الكريفون واليوسفي وعدم تأثير البرتقال والبوملي والنارنج، يمكن أن يرجع السبب إلى محتوى terpinene-4-ol الذي كانت نسبته في الليمون 0.258%، و0.060 و0.076 % في الكريفون واليوسفي على الترتيب، في حين خلت بقية الزيوت منه.

فيما يتعلق ببكتريا *K. pneumoniae* وجد أن أعلى تأثير للزيت المستخلص من الليمون ثم البرتقال والكريفون وعدم تأثرها بزيوت البوملي واليوسفي والنارنج، وقد يرجع السبب في ذلك إلى محتواها المرتفع نسبياً من مركب β-phellandrene الذي كانت

نسبته 1.076 و0.596 و0.632% في الليمون والبرتقال والكريفون على الترتيب، و0.183 و0.108 و0.158% في البوملي واليوسفي والنارنج على الترتيب.

كانت فعالية الزيوت العطرية جميعها متساوية بالنسبة إلى بكتريا *Salmonella* sp. ما عدا زيتي البوملي والنارنج اللذين لم يظهرا فعالية مضادة لهذه البكتريا، وهذا يتوافق مع محتوى هذه الزيوت العطرية من مركبات α-Phellandrene وβ-Phellandrene وβ-Myrcene؛ إذْ كان مجموع نسبها متقارباً في زيوت الليمون والبرتقال والكريفون واليوسفي (2.986 و2.445 و2.336% على الترتيب)، وكان هذا المجموع أقل في زيتي البوملي والنارنج (1.933 و2.241% على الترتيب).

بالنسبة إلى بكتريا *P. mirabilis* لوحظ أن أعلى تأثير للزيوت المستخلصة من البرتقال والليمون، ولا يوجد تأثير لبقية الزيوت المدروسة، ربما يرجع السبب إلى احتوائهما على مركب Eremophilene بنسبة 0.167 و0.320% على الترتيب، في حين خلت بقية الزيوت منه.

يلاحظ أن أعلى فعالية مضادة لبكتريا *E. coli* كان للزيت العطري المستخلص من قشور الليمون واليوسفي والبوملي وبالتركيز المثبط ذاته (100 µl/ml) وعدم فعالية بقية الزيوت العطرية المدروسة (<100 µl/ml). يعتقد أن هذه الفعالية ترجع إلى مركبي α-Phellandrene وβ-Cubebene حيث توافقت الفعالية المضادة لبكتريا *E. coli* مع مجموع نسبتي هذين المركبين (0.379، 0.236 و0.196 % في زيوت الليمون، واليوسفي والنارنج على الترتيب) مقابل ما مجموعه 0.07% في الكريفون وخلا كل من البرتقال والبوملي من هذين المركبين.

وجد أن أعلى فعالية مضادة لبكتريا *H. alvei* كانت للزيت المستخلص من قشور الليمون، يليه زيوت البرتقال والكريفون والبوملي واليوسفي وأن أقل فعالية للنارنج، وهذا يتوافق مع محتواها من مركبات α-Pinene وβ-Pinene وα-phellandrene و-β phellandrene وOctanal؛ إذْ كان مجموع نسبها 9.591 و1.527 و1.62، 1.43 و1.783% في زيوت الليمون والبرتقال والكريفون البوملي واليوسفي على الترتيب؛ وكان هذا المجموع أقل نسبياً في الزيت المستخلص من قشور النارنج (1.158%).

وبالنتيجة تبيّن أن مركب limonene لا ينفرد بالتأثير المضاد للبكتريا وإنّما يتآزر مع مركبات أخرى بدليل أن الزيت العطري المستخلص من قشور الليمون كان الأعلى فعالية عموماً بالنسبة إلى أنواع البكتريا المدروسة جميعها مع أنه يحوي على أدنى نسبة من مركب limonene (62.159%).

REFERENCES المراجع

عودة، ف. 2011.، دراسة تأثير الزيت العطري لقشور ثمار النارنج *Citrus aurantium* من الفصيلة السذابية *Rutaceae* السام للخلايا السرطانية في الأوساط الزرعية. أطروحة ماجستير، قسم العقاقير والنباتات الطبية -كلية الصيدلة -جامعة دمشق.

Agatemor, C., 2009. Antimicrobial activity of aqueous and ethanol extracts of nine Nigerian spices against four food borne bacteria. ***Internet Journal of Food Safety,*** **V.10, pp.77-80**

Celikel, N. and Kavas, G., 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. ***Czech J.Food Sci.*****,V.26, pp.174-181.**

Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P. and García, P., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. ***Food Control*****, V. 22, pp. 896-902.**

Fisher, K. and Phillips, C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oil in food: is citrus the answer? ***Trends in Food Science & Technology*****, V. 19, pp. 156-164.**

George, F. O. A., Ephraim, R. N., Obasa, S. O. and Bankole, M. O., 2009. Antimicrobial properties of some plant extracts on organisms associated with fish spoilage. ***University of Agriculture, P.M.B. 2240, Abeokuta, Ogun State, Nigeria,*** **p. 2.**

Isman, M. B. and Machial, C. M., 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Chapter 3, ***In*****: Advances in phytomedicine 3: naturally occurring bioactive compounds. Rai M. and Carpinella M.C.,** ***Eds. Elsevier, New York, NY.***

Kırbaşlar, F. G. and Kırbaşlar, S. İ., 2009. Composition of cold-pressed bitter orange peel oil from Turkey. ***J. Essent. Oil Res.*****, V. 15, pp. 6-9.**

Kırbaşlar, F. G., Tavman, A., Dülger, B. and Türker, G., 2009. Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. ***Pak. J. Bot.*****, V. 41(6), pp. 3207-3212.**

Lee, S. O., Choi, G. J., Jang, K. S., Lim, H. K., Cho, K. Y. and Kim, J. C., 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. ***Plant Pathol. J.*****, V. 23(2), p. 97.**

Lihandra, E. M., 2007. Assessment of ethanol, honey, milk and essential oils as potential postharvest treatments of grown fruit. M.Sc thesis. Auckland university of technology, New Zealand. p. 43.

Moufida, S. and Marzouk, B., 2003. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. ***Phytochemistry*****, V. 62(8), pp. 1283-1289.**

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S., 2006. ***In vitro*** **antibacterial activity of some plant essential oils. BMC** ***Complementary and Alternative Medicine.*** **V. 6(39), p. 1.**

Shittu, I. A. J., Bankole, M. A., Ahmed, T., Bankole, M. N., Shittu, R. K. , Saalu, C. L. and Ashiru O. A., 2007. Antibacterial and antifungal activities of essential oils of crude extracts of *Sesamum radiatum* against some common pathogenic microorganisms. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* (IJPT), V. 6, pp. 165-170.

Siddique, S., Shafique, M., Parveen, Z., Jabeen, K. S., Khanum, R., 2011. Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus aurantium* var. bitter orange peel oil. *Pharmacologyonline*, V. 2, pp. 499-507.

Sikkema, J., de Bont, J. A. M. and Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem*., V. 269, pp. 8022-8028.

Sikkema, J., de Bont, J. A. M. and Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, V. 59, pp. 2201-2222.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, V. 18(4), pp. 463-470.

Sonboli, A., Eftekhar, F., Yousefzadi, M. and Kanani, M. R., 2005. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Grammosciadium platycarpum Boiss. from *Iran. Z. Naturforsch*., V. 60, pp. 30–34.

Tirado, C. B., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y. and Martinez, J. R., 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, V. 697, pp. 501-513.

Van de Braak, S. A. A. J. and Leijten, G. C. J. J., 1999. Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, V. 19(12), pp. 1130-1138.