الاستخلاص البارد للزيت العطري لقشور ثمار النارنج وقياس فعاليته المضادة للأكسدة والأحياء المجهرية

حنين عبد الأمير الأسدي رمضان نجم الساعدي

المخلص

هدفت الدراسة الحالية الحصول على الزيت من قشور النارنج التي أجريت عليها إلى فحوص كيميائية وفيزيائية وبايولوجية ، إذ كانت نسبة الاستخلاص للزيت **0.30%** وبينت عملية الكشف على الفينولات أنه يحتوي على فينولات وقد كانت النتيجة موجبة مع الكاشف كلوريد الحديديك بظهور اللون الأزرق وقد بلغت كمية الفينولات الكلية بالزيت **40** (**GAE.mg/g**) ، وكانت قيمة **PV** للزيت في التراكيز **50 ppm** و **100 ppm** هي **5.8** و **5.5** على التوالي ، وعند التعرف على المركبات الفينولية في الزيت لقشور النارنج باستخدام **HPLC** و **GC** كانت المركبات الفينولية **Lemonene** و **alpha-penen** و **beta-penen** بالنسب **91.76%** و **2.89%** و **5.24%** على التوالي ، وعند تقدير فعالية الزيت المضادة للميكروبات بالتراكيز **0.5%** و **1%** و**2%** و**3%** كانت قطر الهالة **11,7,4,2** (ملم) على التوالي ضد بكتريا ***Salmonella typhi*** و **13,14,10,5** (ملم) على التوالي ضد بكتريا ***Staphylococcus aureus*** و **11,13,11,5** (ملم) على التوالي ضد بكتريا ***E.coli*** و **11,18,11,4** (ملم) على التوالي مع البكتريا ***Bacillus subtillus*** وعند التراكيز نفسها و **12,15,9,4** (ملم) ضد العفن ***Aspergillus niger*** على التوالي و **12,15,9,5**ضد خميرة ***Candida albicans*** عند التراكيز نفسها وجميعها بفروق معنوية على مستوى **(0.05)>P** ، وكان أقل تركيزاً مثبطاً للزيت المستخلص والقياسي هو **2%** مع الأحياء المجهرية المدروسة كافة وبفروق معنوية مع التراكيز الأخرى المستخدمة.

المقدمة

الاسم الانكليزي للنارنج هو **Sour orange** أما الاسم العلمي له ***Citrus aurantinm L.*** ، تنتشر زراعته بكثرة في جنوب شرق أسيا وخصوصاً في الهند وكذلك في البرازيل ، شكل النبات كبير جداً والثمرة تحتوي على قشرة سميكة ذات لب حامضي (**1**، **2**، **3**) استعملت قشور ثمار النارنج بشكل واسع في صناعة المرملاد والحلوى البريطانية والمربى وكذلك في السلطات وذلك لامتلاكها الطعم الحامضي ولهذا تستعمل بديلاً عن عصير الليمون (**9**،**3**،**17**). استعمل زيت قشور ثمار النارنج تجارياً مهدئاً عاماً وفاتحاً للشهية ومنشطاً عاماً وعلاجاً لعسر الهضم فضلاً عن معالجة التهاب الجفون وألم العضلات والروماتزم واللالتهاب الوريدي (**5**،**8**،**18**). تحتوي قشور ثمار النارنج على نسبة عالية من الزيت العطري الطيار تقدر بـ**90%** وعلى المركبات التالية **flavonoids** و **coumarins** و **triterpenes** و **vitamin C** و **carotene** وعلى **pectin** . تمتلك **flavonoids** العديد من الخصائص المفيدة إذ أنها مضادة للالتهابات ومضادة للبكتريا والفطريات ومضاد للسرطانات وكذلك يستعمل للحمية ولعلاج الإصابة البكتيرية (**22**) . أستعمل زيت قشور النارنج مواداً حافظة للأغذية ولحماية نوعيتها وسلامتها ولإطالة العمر الافتراضي لها وذلك لخواصه المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة (**14**). الأجزاء الطيارة الموجودة في الزيوت الأساسية للحمضيات هي المسؤولة عن %(**85–99**) من وزن الزيت ، سلاسل قصيرة من الكحولات والالدهايدات و الاسترات والتربينات (C_{10} H_{16}) و **sesquiterpenes** (C_{15} H_{24}) و **terpenoid** الموافقة (التي تحتوي على مشتقات الأوكسجين) هي الأساس في هذه الأجزاء الطيارة (**10** ، **23**).

جزء من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول

كلية الزراعة ، جامعة بغداد ، بغداد ، العراق.

المواد وطرائق البحث

الاستخلاص

جمعت ثمار النارنج من محافظة بغداد وأتبعت الطريقة المذكورة من قبل **Kamaliroosta** وجماعته (**13**) إذ تم استخلاص الزيت بالتقطير المائي بواسطة جهاز كلافنجر (**Clevenger**) الموصول إلى دورق حجم **1**لتر إذ أخذ **100** غم من قشور النارنج المطحونة الجافة والمراد استخلاص زيتها ووضعت في الدورق الخاص بالجهاز وأضيف لها **1000** مل من الماء وأجريت لها عملية التقطير المائي بتسخين الدورق من **3–4** ساعات لكل عينة لحين الحصول على اكبر كمية من الزيت ، بعدها استخلص إنموذج الزيت باستعمال قمع فصل (**Separator funnel**) ، اخذ محلول الاستخلاص ووضع في القمع وترك ليبرد ،إذ انفصلت طبقة الزيت للأعلى أما الطبقة السفلى فهي خليط الزيت والماء ، بعد استخلاص الزيت من كل إنموذج تم قياس كميته (مل) ووضع في قنينة زجاجية معتمة في الثلاجة على درجة حرارة **4**مْ لحين أجراء الاختبارات المطلوبة عليها. وقد تم وزن زيت العطري وقدرت نسبة الاستخلاص تبعا للطريقة المذكورة من قبل **Kamaliroosta** وجماعته (**13**) وذلك بوزن الزيت المستخلص إلى وزن مسحوق القشور المستعمل في الاستخلاص كنسبة مئوية كما في المعادلة التالية:

نسبة الاستخلاص = وزن الزيت المستخلص / وزن مسحوق قشور النارنج* **100**

قياس الفعالية المضادة للأكسدة

تم قياس الفعالية المضادة للأكسدة من خلال :

أولا– تقدير كمية الفينولات في زيت قشور النارنج

أتبعت طريقة **Stefan** (**20**) في تقدير كمية الفينولات والنتائج ووضحت كحامض كملغم من حامض الكاليك يعادل غم من زيت قشور النارنج (**GAE. mg /gm**).

ثانيا– تقدير قيمة البيروكسيد

أتبعت طريقة **Mohammad** وجماعته (**15**) في تقدير قيمة البيروكسيد ،إذ قدرت بأتباع المعادلة التالية :ـ

$$PV\ (m\ moles / Kg) = [(V - V_0) * T * 1000] / m$$

ثالثا– تحليل كروموتوغرافي السائل عالي الأداء HPLC

أتبعت طريقة **Ali** وجماعته (**3**) إذ أن كروموتوغرفي السائل عالي الأداء هي تكنولوجيا لفصل المركبات التي تتوزع بين الطور المتحرك والثابت . **HPLC** يستعمل طور متحرك سائل لفصل المركبات في الخليط ، الطور الثابت يمكن أن يكون سائلاً أو صلباً ،إذ فتذاب المركبات أولا تذوب في المذيب وبعدها تدفع من خلال عمود الكروموتوغرافي تحت الضغط . كمية الانحلال مهمة تعتمد على طول التفاعل بين المركبات المذابة والطور الثابت وحسبت النتائج (**mg/g.d.wol**).

رابعا– تحليل كروموتوغرافي الغازGC

حدد التركيب الكيميائي للزيت العطري حسب الطريقة المتبعة من قبل **Jorry** (**12**) باستخدام جهاز **GC** (**Agilent** إنموذجِ **7890A**) المزود بحاقن آلي (**Agilent 7683B**) باستخدام مكتبتي **NIST** و **Wiley** ، استخدم عمود شعري من نوع **DB-1** (**30*****0.25** مم***0.20** مم) وفق البرنامج الحراري : **60**ْ م مدة **4** دقائق ثم **60**ْ ←**64**ْ م بمعدل **1**ْ م/د ثم **64**ْ←**155** م بمعدل **2.5**ْ م/د ثم **155**ْ←**250** م بمعدل **5**ْ م/د. واستخدم

الهيليوم كغاز حامل بمعدل تدفق 1 مل/دقيقة وضبطت درجة حرارة الحاقن عند 250° م ،كمية العينة المحقونة 1 مايكرولتر بمعدل تجزئة 80:1.

خامسا–طريقة DPPH

استخدمت طريقة سعة الإزالة للمركب DPPH (2.2-diphenyl -1 picrylhydrazyl) حسب ما ذكر من قبل Irda وجماعته (11) لملاحظة تأثير الزيت العطري في قشور ثمار النارنج بتركيز 0.5% ، 1% ، 2% ، 3% المضادة للأكسدة ، أخذ 50 (µg/mL) من الزيت العطري وأضيف إلى المركب DPPH بتركيز 20 (µg/mL) (1:1) لبدء التفاعل وبعدها حضنت لمدة 30 دقيقة ، قيست الأمتصاصية على طول موجي 517 نانومتراً باستخدام جهاز Spectrophotometer ، قيست الفعالية المضادة للأكسدة للزيت العطري بالاعتماد على اختزال DPPH لحساب النسبة المطلوبة للفعالية المضادة الأكسدة.

قياس الفعالية المضادة للميكروبات

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر حسب ما ذكر من قبل Adeline وجماعته (4) لملاحظة تأثير الزيت العطري لقشور النارنج بتركيز 0.5% ، 1% ، 2% ، 3% في نمو الأحياء المجهرية التالية *Staphylococcus aureus , Salmonella typhi , Bacillus subtillus , E.coli , Aspergillus niger*) لقح وسط مولر هنتون الصلب المضاف أليه الدم بحسب الحاجة (بواسطة قطنة معقمة من العالق البكتيري الحاوي على $1.5*10^8$ (خلية /مل) . عملت حفر على سطح الوسط الزرعي بواسطة الثاقب الفليني ووضعت التراكيز المحضرة من الزيت العطري بمقدار 0.1 مل لكل حفرة . استخدم الكحول الأثيلي للتأكد بأن ليس له تأثير تثبيطي في نمو البكتريا . تركت الأطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة ، حددت فعالية الزيت العطري بقياس قطر منطقة التثبيط (الهالة) حول كل حفرة . وتم حساب معدل المكررات الثلاثة .

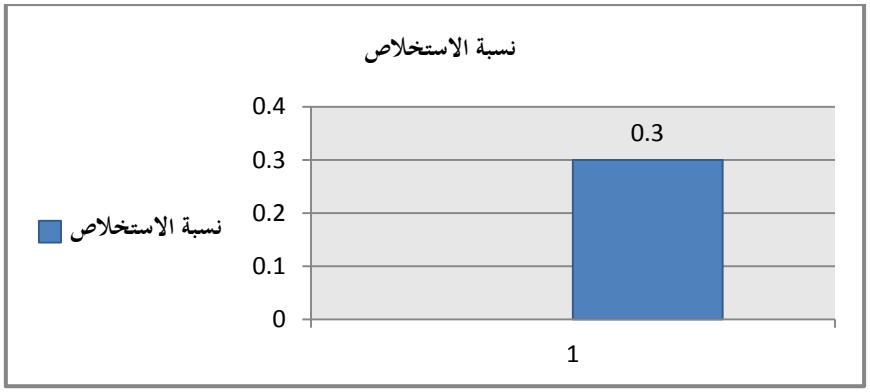
التحليل الأحصائي

استعمل البرنامج الإحصائي SAS– Statistical Analysis System (19) في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرقاً معنوياً (Least significant difference-LSD).

النتائج والمناقشة

نسبة الاستخلاص

بينت نتائج عملية استخلاص الزيت العطري لقشور ثمار النارنج بواسطة طريقة كلافينجر (الاستخلاص الساخن) كما موضحة في شكل (1) إن النسبة المئوية للاستخلاص بلغت 0.30% وهذا يتوافق مع ما ذكره Kamaliroosta وجماعته (13)، إذ حدد بأن نسبة الزيت العطري الموجودة في قشور ثمار النارنج تتراوح (0.70–0.30)%.



شكل 1: النسبة المئوية للزيت العطري المستخلص من قشورالنارنج.

الفعالية المضادة للأكسدة

كمية الفينولات الكلية في الزيت العطري لقشور ثمار النارنج

كانت كمية الفينولات في الزيت العطري لقشور ثمار النارنج **40** (**mg.GAE/g**) وهذه النتيجة أقل لما ذكره **Irda** وجماعته (**11**) إذ أشار إلى أن الحصيلة من الفينولات تتراوح **58.68** (**mg.GAE/g**) وهذه القيمة تعتمد على ظروف الاستخلاص .

قيمة البيروكسيد PV للزيت العطري لقشور ثمار النارنج

أشارت النتائج الخاصة بقيمة البيروكسيد (جدول **1**) إلى إن الزيت العطري لقشور ثمار النارنج قيمة البيروكسيد له **5.8** (**mmoles/kg**) عند استخدام تركيز (**PPm**) **50** من الزيت العطري ، أما عند استعمال تركيز (**ppm**) **100** من الزيت العطري فكانت قيمة البيروكسيد له أقل **5.5** (**mmoles/kg**)، يعزى الإنخفاض في قيم البيروكسيد إلى أن الزيت العطري يمنع تكوين البيروكسيدات (**15**).

جدول 1: قيمة البيروكسيد لقشور ثمار النارنج (**mmoles/Kg**)

تركيز الزيت العطري لقشور النارنج **PPM**	قيمة **PV**
50	**5.8**
100	**5.5**
قيمة **LSD**	**NS 0.482**
NS: غير معنوي.	

تحليل الكروموتوغرافي السائل عالي الأداء HPLC

يوضح جدول **2** المركبات الفينولية الموجودة في الزيت العطري لقشور ثمار النارنج ، **Lemonene** هو المركب الأساس الذي يسهم في القابلية المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات في الزيت العطري لقشور ثمار النارنج إذ كانت نسبته عالية تصل إلى **91.76%** ، تلاها المركب **beta -pinen** إذ أن نسبته **5.24%** ، بعدها المركب **alpha-pinen** نسبته **2.89%** ، وهذه الكميات متقاربة مع المذكورة من قبل **Summer** (**21**) ،إذ وجد أن نسبة **Lemonene** هي **80.12%** و **alpha-pinen** هي **7.52%** ، أما المركب **beta-pinen** فأن نسبته هي **4.82%**.

جدول 2: المركبات الفينولية الموجودة في زيت قشور ثمار النارنج

المركب الفينولي	نسبة المركب (%)
Lemonen	**91.76**
beta-pinen	**5.24**
Alpha-pinen	**2.89**
Total	**99.89**

تحليل كروموتوغرافي الغاز GC

تبين نتيجة التحليل باستخدام جهاز GC احتواء الزيت العطري لقشور ثمار النارنج على المركبات الفينولية كما مبينة في جدول 2 إذ يلاحظ من الجدول السابق إن **Lemonen** هو المركب السائد في الزيت العطري لقشور ثمار النارنج وقد بلغت نسبته **91.76%** وهذه النتائج قريبة من النتائج التي سجلها **Jorry** (12).

طريقة DPPH

DPPH عبارة عن الجذور الحرة الثابتة التي بدورها تذوب في محاليل الميثانول أو الأيثانول ، الألوان هي التي توضح خصائص الامتصاصية على طول موجي **517** نانومتر وتزال هذه الألوان بواسطة مضادات الأكسدة (16). بينت نتائج قيم فعالية الزيت العطري لقشور ثمار النارنج على وجود فروق معنوية على مستوى ($P<0.05$) مع الزيت القياسي المستورد من شركة **Ajinomoto (France)** بالتراكيز جميعها ، وأن أفضل تركيزاً للزيت العطري المضاد للأكسدة هو **3%** كما موضح في جدول **3** .

جدول 3: فعالية الزيت العطري لقشور ثمار النارنج المضادة للأكسدة

الزيت	التركيز (%)	سعة إزالة DPPH (%)
الزيت القياسي	0.5	55.5
	1	55.7
	2	56.5
	3	57.2
الزيت المستخلص	0.5	54.6
	1	55.2
	2	55.9
	3	56.4
قيمة LSD		3.524*

الفعالية المضادة للميكروبات

أشارت نتائج قيم فعالية الزيت العطري لقشور ثمار النارنج إلى وجود فروق معنوية على مستوى ($P<0.05$) مع الزيت القياسي لأنواع الأحياء المجهرية المدروسة كافة الذي يعود إلى الطريقة المستخدمة في الاستخلاص ، إذ أن بتركيز **0.5%** كانت قطر هالة التثبيط (ملم) قليلة جدا لأنواع الأحياء المجهرية جميعها كما موضحة في جدول **4**، أما عند استعمال تركيز **1%** من الزيت العطري فقد أزداد قطر هالة التثبيط ، أما أفضل تركيز لزيت العطري لتثبيط الأنواع المجهرية كافة فهو **3%** ، إذ كان قطر هالة التثبيط ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام ***Stapylococus aureus*** هو **15**(ملم) إذ أنها أكثر حساسية من البكتريا ***E.coli*** و ***Salmonella typhi*** إذ كان قطر هالة التثبيط كانت **13** و **7** على التوالي وهذا مقارب مع ما ذكره **Djamel** (7) ، بخصوص عفن ***Aspergillus niger*** فكان قطر هالة التثبيط **15**(ملم) ، فيما يخص خميرة ***Candida albicans*** فكان قطر الهالة **15**(ملم) وهذه النتائج

مقاربة مع ما ذكره **Adeline** وجماعته (**4**) ، تعزى الفعالية المضادة للميكروبات للزيت العطري إلى احتوائه على المركبات الفينولية الفعالة ومنها **Lemonene** بأعلى نسبة.

جدول 4: تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط للزيت العطري لقشور ثمار النارنج

الزيت	التركيز (%)	نوع الكائن المجهري (ملم)					
		Salmonella-typhi	*Staphylococcus-aureus*	*E-Coli*	*Bacillus-subtillus*	*Aspergillus-niger*	*Candida-albicans*
الزيت القياسي	0.5	5	5	4	3	5	6
	1	9	10	4	2	10	11
	2	15	15	14	13	14	15
	3	10	10	10	10	12	13
الزيت المستخلص	0.5	2	5	5	4	4	5
	1	4	10	11	11	9	9
	2	7	14	13	18	15	15
	3	2	13	11	11	12	12
قيمة LSD		* 4.612	* 5.094	* 4.773	* 4.569	* 4.275	* 4.264

* ($P<0.05$).

المصادر

1–الحلفي ، سوسن علي حميد (2009). استخلاص بعض المركبات الفينولية من مصادر نباتية واستعمالها كمضادات أكسدة ومثبطات ميكروبية وتطبيقها في الأنظمة الغذائية. أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة،العراق.

2–رضوان، بدر الدين ؛ بسام العقلة و لينة الأمير (2012). دراسة التركيب الكيميائي والتضاد البكتيري للزيوت العطرية المستخلصة من قشور ثمار الحمضيات. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية ، قسم التقانات الصناعية والغذائية ، 29(2).

3-Ali, R.; A. Ahmed and A. Abdul- Mutalib (2016). Phytochemical investigation of synephrine in the fruit peels of Iraqi sour orange. World J., of Pharmacy and Pharmaceutical Sci., 5, (3): 246-256.

4-Adeline, D.; J. Sheila; F. Estherlydia; P. Iyer and S. Priyadarshini (2016). Study on the antimicrobial property of bitter orange*(Citrus aurantium L.)* Peel powder and developing recipeusing the powder. International J., of Home Sci., 2(2): 125-131.

5-Aref, I.L.; K.B.H. Salah; J.P. Chawmont; A.W. Fekih and M. Aouni (2010). *citrus-aurantium* used in Treatment of Various Diseases. African J., of Food Quality and Hazards Control, 5: 51-56.

6-Boudries, H; S. Loupassaki; E. Ladjal; S. Souagui; B. Bachir; N. Nabet; A. Chikhoune; K. Madani and M. Chibane (2017). Chemical profile, antimicrobial and antioxidant activities of Citrus reticulata and Citrus clementine (L.) essential oils. International Food Res., J., 24(4): 1782-1792.

7-Djamel, D. (2015). Chemical Profile, Antibacterial and Antioxidant Activity of Algerian Citrus Essential Oils and Their Application in Sardina pilchardus Foods, 4, 208-228; doi:10.3390/foods 4020208.

8-Filomena, N; F. Florinda; D. Laura; C. Raffaele and D. Vincenzo (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals, 6: 1451-1474.

9-Frassinetti, S.; L. Caltavuturo; M. Cini; C. Della and B. Maserti (2017). Antimicrobail and Antioxidant Activity of Essential Oils from citrus spp. J., of Essential Oil Res., 23 : 1-6.

10-Hoa, F. (2014). Authenticity analysis of citrus essential oils by means of HPLC-UV-MS on oxygenated hetrocyclic components Ph.D. Thesis, The State Uni., of New Jersey, USA.

11-Irda, F.; H. Monia; M. Insanu (2014). Evaluation of antioxidant activities from various extracts of sweet orange peels using DPPH, FRAP assays and correlation with phenolic, Flavonoids, carotenoid content. Asian J. Pharm. Clin. Res., 7(3):186- 190

12-Jorry, D. (2008). Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from asia. Ph.D. Thesis National Uni., of Singapore.

13-Kamaliroosta, L.; M. Zolfaghari; S. Shafiee; K. Larijani and M. Zojaji (2016). Chemical Identifications of Citrus Peels Essential Oils. J., of Food Biosciences and Tech., Islamic Azad Uni., Sci., and Res., Branch. 6(2): 69-76.

14-Kaneria, M.; Y. Baravalia; Y. Vaghasiya and S. Chanda (2009). Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra region, India. Indian., of Pharmaceutical Sci., 71:406-412.

15-Mohammad, A.; G. Mehdi; G. Mohammad and D. Pegah (2015). Effect of Aerial parts of uritiea dioica (uriticaecae) on stability of soya bean oil . J., of Pharmaceutical Res., 10 (1):125 – 131.

16-Moosavy, M.; P. Hassanzadeh; P. Mohammadzadeh; R. Mahmoudi; S. Khatibi and K.Mardani (2017). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Lemon (*Citrus limon*) Peel in Vitro and in a Food Model. J., of Food Quality and Hazards Control, 4: 42-48.

17-Muhammad, M.; S. Rehman; T. Mahmood; N. Muhammad and A. Muhammad (2016). Variabiability in peel composition and quality evaluation of peel oils of citrus varieties. J., of Agric. Res., 54 (4):747-756.

18-Predrag, P.; B. Danijela; R. Anet; J. Francisco; C. Giancarlo; B. Arianna M. Jose and S. Avi (2017). Innovative "Green" and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus. Molecules, 22: 680-685.

19-Stastical Analysis System (SAS) (2012). International Food Res. J., 24(4): 1782-1792.

20-Stefan, B. (2015). General practical course in chemistry. uni., of Zurich, P 46

21-Summer, B. (2017). Bitter orange-The fruit with boost metabolism. https/www.dietspotlight.com /bitter-orange.health.

22-Suryawanshi, F. and A. Jyotsna (2011). Saonere an Overview of Citrus. Asian J. Pharm. Clin, Res., 8(2): 182-186.

23-Victor, R. (2016). Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Department of Nutrition and Dietetics King's College London, London, UK. Academic Press is an imprint of Elsevier.

COLD EXTRACTION OF CITRUS-PEELS OIL AND DETERMATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

H. A. Alasadi **R. N. Al-Saidi**

ABSTRACT

The aim of current study is obtain oil from citrus-peels waste, and then exposure to chemical , physical and biological tests to achieve this goal , the percentage of oil extraction was 30% and that detecting process of phenols showed that oil contain phenols and the result was positive with ferric chloride detector by appearance the blue color and the quantity of whole phenols in oil was 40 (GAE. mg /g), and the PV for oil in concentration 50 ppm and 100 ppm was 5.8 and 5.5 respectively , when evaluation phenolic compounds in citrus-peels oil by using HPLC and GC, the phenolic compounds was limonene , alpha-penen and beta-penen with concentration 91.7%, 2.89% and 5.24% respectively , when evaluation antimicrobial activity for oil in concentration (0.5, 1, 2 and 3)%, the diameter of clear zone was 2,4,7 and 11 (mm) respectively against *salmonella typhi* bacteria and 5,10,14 and 13 (mm) respectively against *staphylococcus aureus* bacteria and 5,11,13 and 11 (mm) respectively against *E.coli* bacteria and 4 ,11 , 1 and 11 (mm) respectively against *Bacillus subtillus* bacteria and in same concentration the diameter of clear zone against *Aspergillus niger* mold was 4, 9, 15 and 12 (mm) respectively and 5,9,15 and 12 (mm) against *candida albicans* yeast, all them with differences on p<(0.05), the minimum inhibition concentration to extracted oil was 2% with all study microorganism with differences on P<(0.05).

Part of Ph.D. Thesis For The First Author.
Baghdad Univ., College of Agric., Baghdad,Iraq.