دراسة أثر التضاد بين الأحياء الدقيقة المعزولة من شرائح المرتديلا المستهلكة في السوق الأردنية ومستخلصات مائية لأعشاب عطرية محلية

نصر أحمد حسنين[1] عبد الحكيم عزيزية[2] صالح أبو الخير[3]

الملخص

هدف البحث إلى دراسة تثبيط الأحياء الدقيقة المعزولة من شرائح مرتديلا أردنية بإستخدام مستخلصات مائية لأربعة أعشاب عطرية محلية، من خلال مجموعة واسعة من التحليلات الميكروبية عزلت خمسة أنواع من البـــكتيريا السالبة لصبغة غرام هي: *Enterobacter gergoviae* و *Serratia marcescens* و *Klebsiella oxytoca* و *Salmonella arizonae* و *Citrobacter freundii*. وتسعة أنواع من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام هـــي: *Staphylococcus saprophyticus* و *Staphylococcus simulans* و *Staphylococcus Lentus* و *Streptococcus bovis* و *Lactococcus lactis* و *Lactococcus raffinolactis* و *Enterococcus durans* و *Enterococcus hirae* و *Listeria ivanovii* وعفنى *Penicillium* و *Rhizopus* وخميرة *Saccharomyces*. حُضّرت المستخلصات المائية للزعتر والزنجبيل والكراوية وإكليل الجبل بطريقة النقع بالماء الساخن بنسبة 1: 10. قُدّر تثبيط البكتيريا والفطور للمستخلصات بإجراء التعداد الكلي بإضافة وعدم إضافة المستخلصات. بيّنت نتيجة التحليل الإحصائي ANOVA أن مستخلص الزعتر كان الأفضل في عملية التثبيط يليه إكليل الجبل فالكراوية بينما كانت فعالية الزنجبيل الأقل.

الكلمات المفتاحية: تثبيط الأحياء الدقيقة ، مستخلصات مائية ، شرائح المرتديلا الأردنية

(1) طالب دكتوراه – قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة. جامعة دمشق – دمشق
(2) و(3) أستاذ – قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة. جامعة دمشق – دمشق

1. المقدمة والدراسات السابقة:

يعد اللحوم ومنتجاته حساس لعوامل الفساد المختلفة لإحتوائه على عناصر غذائية متكاملة ونشاط مائي مرتفع (Almansi, 2003). وشكّل حفظ اللحوم المصنعة تحديا كبيرا فاستخدمت بالإضافة لطرائق الحفظ المعروفة من تجفيف وتعليب وتبريد وتجميد عدة أنواع من المضافات الغذائية الطبيعية والمحاليل الكيميائية (Feiner, 2006). وتهدف المضافات الغذائية إلى تحسين الصفات الحسية كاللون والنكهة والقوام، والمساهمة بشكل فعّال في عملية حفظ المادة الغذائية من الفساد الكيميائي كالتأكسد والتزنخ والفساد الميكروبي من بكتيريا وفطور وخمائر (JECFA,1994). أثبتت العديد من الدراسات وجود مخاطر صحية للمضافات الغذائية الكيميائية (Luck and Jager,1997) (Gould, 1995)، ونشط الباحثون لإيجاد بدائل لهذه المضافات من خلال إستخدام البهارات والأعشاب المحلية المختلفة (Agaoglu et al, 2007). ولم تكن عملية إيجاد البدائل الطبيعية سهلة على الباحثين، لتنوع هذه المواد وآثارها المختلفة، فقد يكون لبعضها أثر جيد كمضاد للأكسدة ولكنه في الوقت ذاته يزيد من المحتوى الجرثومي للمادة المصنعة (Alassaf, 2003). وسواء كان الأثر الايجابي لهذه الأعشاب بيولوجياً أو كيميائياً فلا بد من مراعاة وقت وكمية وتركيز وشكل الإضافة للحصول على النتائج المرجوة (الساعد، 1995)، ويجب الأخذ بعين الاعتبار طبيعة المادة الغذائية وتناسب الأعشاب معها من حيث التركيب الكيميائي والرقم الهيدروجيني pH والحمل الميكروبي والتعبئة والتخزين والتداول والعادات الاستهلاكية المتغايرة وغيرها من العوامل (Gulmez and Vatansever, 2006) (IFST, 1993). يعود الأثر المثبط للأحياء الدقيقة من قبل الأعشاب العطرية إلى العديد من المركبات الموجودة في زيوتها العطرية والتي قد تكون في الأوراق أو السوق أو البراعم أو الأزهار أو الثمار(Adeleye et al, 2003)، ويتم التثبيط من خلال التأثير على جدار أو DNA الخلية الجرثومية أو وقف النشاط الاستقلابي أو النشاط الأنزيمي والبروتيني، وبغض النظر عن طبيعة التأثير فان الدور المثبط للأعشاب العطرية يختلف عن عملية التعقيم بأن فعاليته تتم خلال أيام وليس مباشرة ويضاف في طور النمو التمهيدي وقبل الطور اللوغارتمي (Reist, 2004). تُحضّر المستخلصات المائية للأعشاب العطرية بعدة طرائق أهمها طريقة النقع بالماء البارد أو المغلي لمدة زمنية من 10 دقائق إلى 24 ساعة حيث وكلما زادت مدة النقع أو إرتفعت حرارة الماء تم الحصول على كمية أكبر من المادة الفعالة وزادت إحتمالية إرتفاع النشاط الميكروبي (Zohary and Hopf, 2000). كما تحضر المستخلصات المائية بالغلي مع الماء مباشرة ولا تفضل هذه الطريقة لتأثيرها سلبا على المواد الفعالة، وتتضمن الطريقة الثالثة طحن الأعشاب ومزج مسحوقها مع الماء الفاتر وتستخدم هذه الطريقة عادة عند استخلاص الزيوت العطرية من الأعشاب والبهارات (Lesley, 1994).

ينتمي الزعتر Thyme واسمه العلمي *Thymus vulgaris* إلى العائلة *Lamiaceae*، تستخدم الأجزاء الهوائية منه (Farrell, 1990). يحتوي الزعتر على العديد من المواد الفعالة تقف وراء أثره كمضاد للأحياء الدقيقة ومضاد للأكسدة وإستخداماته الطبيـــــــــــــــــة المختلفة أهمها Thymol و Carvacrol و flavonoids و Biphenyls و Menthol و Menthone و Labiatin acids و 1,8-cineol و Terpenic esters (Britton and Kircher, 1998). بين Mounia *et al* (2006) أن الزعتر كان الأفضل من بين 60 مستخلص في تثبيط بكتيريا *Pseudomonas putida* المعزولة من اللحم. كما بين (Synder, 2009) أثرا متوسطا لفعالية الزعتر ضد الأحياء الدقيقة إذا ما قورن بأثر أشد للخردل وأثر اضعف للزنجبيل.

الزنجبيل Ginger واسمه العلمي *Zingiber officinale*، موطنه الأصلي الصين وشرق آسيا، ينتمي للعائلة الزنجبارية *Zingiberaceae*، يستخدم ساقه الجذري المسمن بعد جفافه في عدة استخدامات طبية وغذائية (Kikuzaki et al, 1994)، يتصف بفعالية مضادة للأكسدة ومضادة للأحياء الدقيقة تعود لمكوناته من المواد الفعالة وأهمها مواد zingiberene وar-curcumene وβ-sesquiphellandrene وβ-phelladrene وcineol وfarnesene وcitral (UMMC, 2006). أوضح Boskou and Lagouri(1995) فعاليته كمضاد للأكسدة، بينما اثبت Chen *et al.*(2007) فعالية الزنجبيل كمضاد للنشاط الميكروبي.

ينتمي إكليل الجبل Rosemary إلى العائلة *Lamiaceae* واسمه العلمي *Rosmarinus officinalis* تستخدم أجزاؤه الهوائية في إستخدامات طبية وغذائية واسعة (Peter, 2001)، أهم المواد الفعالة هي Therein, 1,8-cineol وcamphor وα-pinene وFlavonoids وMonoterpenoids وSesquiterpenoids وMonoterpenols وTerpenic esters وTerpenic acids وDi- and Triterpenoid وMonoterpenons (Bremness, 1994). أثبت Mounia *et al* (2006) وجود فعالية جيدة لإكليل الجبل ضد بكتيريا *Pseudomonas putida* المعزولة من اللحم، بينما أكد Schroter and Gerhardt (1983) فعالية إكليل الجبل كمضاد للأكسدة.

الكراوية Caraway تنتمي للعائلة *Apiaceae* واسمها العلمي *Carum carvi*. لثمارها المعروفة باسم بذور الكراوية عدة إستخدامات طبية وغذائية (Peter, 2001). من أهم المواد الفعالة بها dihydrocarveol وcarvone وlimonene وcarveol وα- & β-pinene وsabinene (Shaw, 2000).

هناك مجموعة واسعة من الأحياء الدقيقة المسببة لفساد اللحوم ومنتجاته تبدأ بالبكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام، وتنتهي بالخمائر والأعفان (Feiner, 2006). تتضمن البكتيريا الموجبة لصبغة غرام من أجناس أنواع عديدة أهمها: بكتيريا *Bacillus* و*Clostridium* و*Streptococcus* و*Staphylococcus* و*Listeria*، وتضم البكتيريا السالبة لصبغة غرام أنواع من أجناس متعددة أهمها: بكتيريا *Pseudomonas* و*Escherichia* و*Salmonella* (ICMSF, 1986) و(Feiner, 2006). تعد الأعفان *Penicillium* و*Mucor* وعائلة الخميرة *Saccharomycetaceae* من أهم أنواع الفطريات المرتبطة بفساد اللحوم (Robert et al, 1995). تنتقل معظم البكتيريا والفطور إلى اللحم المصنّع إما عن طريق التلوث ببيئة وظروف التحضير كالأدوات والأشخاص المتعاملين مثل بكتيريا الكوليفورم (Gunter and Peter, 2007). لقد لوحظ أن بعض أجناس *Clostridium* و*Staphylococcus* يمكن ان تعزل عند عدم كفاءة حرارة التحضير، بينما تعزل بكتيريا *Pseudomonas* والفطريات من المنتجات المبردة (Michael, 1989) (ICMSF, 1980) (Ray, 2001).

2. أهداف البحث:

نظرا للإنتشار الواسع لإستهلاك شرائح المرتديلا في السوق الأردنية وبخاصة لدى فئة الأطفال وطلاب المدارس، ولأهمية هذه الدراسة في مجال حفظ هذا النوع من المنتجات، ونظرا لعدم توفر أبحاث في مجال عزل وتشخيص الأحياء الدقيقة المسببة لفساد شرائح المرتديلا الأردنية وأثر التضاد بينها وبين مستخلصات مائية لأعشاب عطرية محلية كان الهدف من هذا البحث ما يلي:

1. عزل وتشخيص الأحياء الدقيقة في شرائح المرتديلا المستهلكة في السوق الأردنية.
2. تحديد أثر المستخلصات المائية للزعتر والزنجبيل والكراوية وإكليل الجبل على الأحياء الدقيقة التي تم عزلها.
3. تحديد أفضل المستخلصات المائية للأعشاب العطرية تبعا لقدرتها على تثبيط الأحياء الدقيقة المعزولة.

3. مواد البحث وطرائقه:

3-1.عزل وتحضير المستعمرات البكتيرية:

تم عزل الأحياء الدقيقة من شرائح مرتديلا جُمعت من السوق الأردنية تمثل أنواع منتشرة ومستويات نظافة مختلفة لمحلات التداول بعد تركها في براد (Sharp ياباني المنشأ) عند درجة 4 – 6 °م لحين ظهور مظاهر الفساد واضحة بشكل حسي عليها. شُخّصت الفطور أولاً تحت المجهر باستخدام الأطلس الخاص بها وحُضّرت منها مستعمرات نقية على بيئة Dichloran Rose Bengal agar (BAM, 2003) (Robert et al, 1995). شُخّصت البكتيريا من خلال مجموعة كبيرة من الإختبارات الميكروبية تضمنت إختبار التعداد الكلي للبكتيريا (ISO 4833, 2003)، وإختبار الكوليفورم و *E.coli* (ISO 4831, 2006)، وإختبار عزل *E.coli O157:H7* (ISO 16654, 2001)، وإختبار بكتيريا *Campylobacter spp.* (ISO10272-1, 2006). وإختبار عزل Proteolytic Bacteria (American P.H.A., 1984)، وإختبار عزل *Clostridium perfringens* (ISO 7937, 2004)، وإختبار عزل بكتيريا *Bacillus cereus* (ISO 7932, 2004)، وإختبار عزل بكتيريا *Pseudomonas spp.* (Jeppesen, 1995)، وإختبار عزل *Entreococcus feacalis* (American P.H.A., 1984)، وإختبار عزل *Staphylococcus aureus* (ISO 6888-1, 2003). وإختبار عزل بكتيريا *Salmonella* (ISO 6579, 2002)، وإختبار عزل بكتيريا *Listeria* (ISO 11290-1, 2004) و(ISO 11290-2, 2004) و(Duarte G et al, 1999). حيث تم استخدام بيئات مختلفة حسب مخططات التحليل المختلفة من إنتاج شركات Oxoid الأمريكية وLAB الإنجليزية وHIMEDIA الهندية وCONDA الإسبانية. كما إستخدم Anaerobic Kits من إنتاج شركة Oxoid، وحاضنات نوع Memmert الألمانية ومعقم عامودي موديل CD-VAC-75A منشأ الصين. كما أجريت فحوصات التشخيص البيولوجية باستخدام التقنيات الحديثة الخاصة بكل مجموعة ونوع بكتيري. حيث

استُخدم لتشخيص البكتيريا السالبة لصبغة غرام نظام Gram-negative identification System Microbact 12A. وشُخصت *Listeria* بإستخدام *Listeria* identification System Microbact 12A. واستُخدم Campylobacter Test Kit لتشخيص المستعمرات المشككة لبكتيريا *Campylobacter*، واستخدم نظام Oxoid Biochemical Identification System لتشخيص المستعمرات المشككة *Enterococcus*. واستخدم BBL CRYSTAL Gram-Positive Identification system لتشخيص البكتيريا الموجبة لصبغة غرام وهذه الأنظمة من إنتاج شركتي Oxoid وBD الأمريكيتين، شُخصت الخميرة باستخدام API 20C Yeast Identification System (Kiss, 1984). تم حفظ مستعمرات نقية من كل بكتيريا وعفن والخميرة لحين الاستخدام.

3-2.تحضير المستخلصات المائية:

إستخدمت أعشاب جافة محلية ذات لون طبيعي لا تحتوي شوائب غريبة تتكون من الجزء الفعال في الأعشاب المطلوبة، تم وزن 10 غم من كل عشبه على حدة (باستخدام ميزان حساس نوع Sartorius صناعة كندية). حُضّر كل مستخلص بغلي 100 مل من ماء شرب ومن ثم إضافة العشبة الجافة لها وتترك العشبة منقوعة لمدة 15 دقيقة. تم تصفية المحتويات بواسطة شاش مخبري. رشحت المستخلصات باستخدام أوراق ترشيح Whatman No1، وعُقّمت باستخدام جهاز الترشيح تحت التفريغ Vacuum filtration unit (موديل JE- DY- I شنغهاي) باستخدام أوراق الترشيح الميكروبية Membrane filter Papers نوع سيلولوز _ نيتريت ماركة Sartorius stedim الألمانية (Sivarooban et al, 2006). حفظت المستخلصات المائية على درجة حرارة – 20 °م في زجاجات Duran الألمانية المعقمة باستخدام فريزر نوع National Electric أمريكي الصنع لحين الاستخدام. عُقّمت الزجاجيات المستخدمة على درجة حرارة 170 °م لمدة ساعتين في فرن نوع Memmert صناعة ألمانية (Kiss, 1984). أجري اختبار التأكد من تعقيم المستخلصات المائية بإجراء التعداد الكلي للبكتيريا لكل 1 مل من كل مستخلص بإتباع طريقة الأيزو القياسية (ISO 4833, 2003) بإستخدام بيئة Plate count agar (PCA).

3-3.إختبار التضاد الميكروبي:

تم إعتماد طريقة التعداد الكلي لكل بكتيريا أو عفن أو خميرة مع وبدون إضافة المستخلص المائي لمعرفة مقدار التثبيط الميكروبي للمستخلصات المائية. الخطوة الأولى كانت بحقن مستعمرات نقية من كل ميكروب إلى أنبوب يحتوي 9 مل من بيئة (Brain Hart Infusion broth (BHI broth وحضنها على درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة بالنسبة للبكتيريا و25°م لمدة 72 ساعة بالنسبة للعفن والخميرة للحصل على نموات ميكروبية نشطة بتركيز 10^{9} (Mounia *et al.*, 2006). وتمت الخطوة الثانية بإجراء تخفيف للأحياء الدقيقة باستخدام أنابيب تحتوي 9 مل من بيئة (Brain Hart Infusion broth (BHI broth لغاية تخفيف 10^{-2} بأخذ 1مل من كل تخفيف إلى الأنبوب التالي. تم بعد ذلك أخذ 1مل من تخفيف 10^{-2} إلى

خمسة أطباق بتري فارغة (1 مل / طبق)، أضيف لكل طبق من الأطباق الأربعة 1مل من كل مستخلص بينما ترك الطبق الخامس يحتوي على الميكروب فقط، وتم ذلك بعمل ثلاثة مكررات لكل ميكروب مع كل مستخلص مائي. لعد البكتيريا تم إضافة بيئة Plate count agar (PCA) لأطباق عد البكتيريا وبيئة Dichloran Rose Bengal agar لعد الأعفان والخميرة، وحضنت الأطباق الخاصة بالبكتيريا على درجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة وبالنسبة للأعفان والخميرة على25°م لمدة 72 ساعة (Sivarooban et al, 2006). والمخطط رقم 1 يوضح طريقة العمل.

مخطط (1): خطوات إختبار فعالية المستخلصات باستخدام طريقة التعداد الكلي

تم قراءة النتائج وعد الأحياء الدقيقة، بعمل ثلاثة مكررات لكل تجربة. وتم تحليل النتائج باستخدام تحليل التباين (ANOVA) Analysis of Variance للمعدلات وحساب قيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.05 باستخدام برنامج SPSS المحوسب (البلداوي، 2009) و (Sheridan, 2001).

4. النتائج والمناقشة:

شُخّص نوعان من الفطور هي *Penicillium* و*Rhizopus*، وشخصت خميرة *Saccharomyces spp.* فُصلت البكتيريا السالبة عن الموجبة لصبغة غرام باستخدام التصبيغ المجهري. أعطت المستعمرات السالبة لصبغة غرام نتيجة سلبية لفحص Oxidase مما يعني أنها من مجموعة Enterobacteriaceae. إستخدم نظام Gram-negative identification System Microbact 12A لتشخيصها فكانت النتيجة النهائية بعزل خمسة أنواع هي: *Enterobacter gergoviae* و *Serratia marcescens* و *Klebsiella*

oxytoca و *Salmonella arizonae* و *Citrobacter freundii*. شُخّصت البكتيريا الموجبة لصبغة غرام باستخدام أنظمة التشخيص المختلفة وأهمها نظام BBL CRYSTAL Gram-Positive Identification system وكانت النتيجة عزل تسع منها هي: *Listeria ivanovii* و *Staphylococcus saprophyticus* و *Streptococcus bovis* و *Lactococcus lactis* و *Enterococcus hirae* و *Lactococcus raffinolactis* و *Enterococcus durans* و *Staphylococcus simulans* و *Staphylococcus lentus*. تعتمد أنظمة الكشف الخاصة بالبكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام على إجراء مجموعة من الإختبارات البيولوجية تترجم نتائجها رقمياً على شكل رقم تشخيصي Octal Code يتم إستخدامه من خلال برامج محوسبة تحدد نوع البكتيريا ونسبة الاحتمالية منوياً.

إن احد أهم أهداف هذا البحث هو إمكانية الاستفادة من نتائجه في تطبيقات عملية لاحقة تهدف إلى إمكانية إستخدام المستخلصات المائية في حفظ شرائح المرتديلا. لذلك فقد تم استخدام أعشاب جافة محلية وتحضير مستخلصات مائية بطريقة النقع كونها الطريقة الأنسب لهذه الدراسة. وقد تم استبعاد طريقة التحضير بالغلي مع الماء لما لها من سلبيات في تحطم وتطاير المواد الفعالة (Abbas, 2004) واستبعدت طريقة النقع في ماء فاتر لمدة تزيد عن 10 ساعات لاحتمالية زيادة التلوث الميكروبي، واستبعدت طريقة الطحن والمزج مع الماء لصعوبة إجراء عملية الترشيح الميكروبي لاحقا. إستخدم ماء الشرب الاعتيادي Tab water لمحاكاة الواقع العملي التطبيقي في تحضير هذه المستخلصات. واستخدمت نسبة 10:1 (عشبة وزنا إلى ماء حجما) للحصول على أكبر تركيز ممكن من المادة الفعالة في المستخلص المائي (Sivarooban et al, 2006). تم إستخدام أوراق الترشيح الميكروبية Membrane Filter Papers نوع سيلولوز- نيتريت وبقطر لا يتجاوز 0.45 ميكرومتر لغاية تعقيم المستخلصات لكون هذا القطر لا يسمح بمرور الأحياء الدقيقة ومنها البكتيريا والفطريات. كانت نتيجة التعداد الكلي للبكتيريا سلبية لمقدار واحد ملليمتر من المستخلص المائي، مما يدل على التعقيم الفعال للمستخلصات. وقد تم استخدام طريقة التعقيم البارد حتى لا يؤثر التعقيم الحراري على المواد الفعالة في هذه المستخلصات. حفظت على درجة حرارة – 20 °م لضمان ثباتها لحين الاستعمال.

يبين الجدول رقم (1) نتائج التضاد بين المستخلصات المائية الأربعة والأحياء الدقيقة، مع بيان الفروقات المعنوية للتثبيط في حال وجوده. حيث أن العدد الميكروبي للشاهد هو للبكتيريا أو للعفن أو للخميرة بدون إضافة المستخلص المائي، بينما العدد الميكروبي لكل مستخلص مائي (إكليل جبل، كراوية، زعتر، زنجبيل) هو للأحياء الدقيقة مع إضافة المستخلصات. كذلك فقد تم ترتيب الأحياء الدقيقة في الجدول حسب ثلاث مجموعات. المجموعة الأولى (من 1 إلى 5) وتمثل البكتيريا السالبة لصبغة غرام. بينما تمثل المجموعة الثانية (6 إلى 14) البكتيريا الموجبة لصبغة غرام. وتمثل المجموعة الثالثة (15 إلى 17) الفطريات من أعفان وخميرة.

جدول (1): نتائج التضاد بين المستخلصات المائية الأربعة والأحياء الدقيقة

الرقم	أسماء الأحياء الدقيقة المسببة لفساد شرائح المرتديلا	العدد الميكروبي: وحدة مكونة للمستعمرات / مل				
		الشاهد	إكليل الجبل	الكراوية	الزعتر	زنجبيل
1	*Enterobacter gergoviae*	^{a}555	^{ab}330	^{a}310	^{f}120	^{d}410
2	*Serratia marcescens*	^{a}155	^{d}112	^{d}134	^{a}70	^{c}142
3	*Klebstella oxytoca*	^{a}122	^{a}120	^{c}108	^{c}14	^{a}120
4	*Salmonella arizonae*	^{a}340	^{ab}240	^{a}335	^{c}20	^{b}320
5	*Citrobacter freundii*	^{a}116	^{a}52	^{a}115	^{a}8	^{b}112
6	*Lactococcus lactis*	^{a}380	^{f}290	^{c}340	^{f}100	^{a}370
7	*Streptococcus bovis*	^{a}180	^{a}170	^{b}150	^{f}70	^{c}140
8	*Enterococcus hirae*	^{a}740	^{a}735	^{a}730	^{a}100	^{a}730
9	*Staphylococcus saprophyticus*	^{a}270	^{b}210	^{d}160	^{a}30	^{a}250
10	*Lactococcus raffinolactis*	^{a}300	^{a}200	^{a}290	^{q}50	^{a}295
11	*Enterococcus durans*	^{a}125	^{a}121	^{a}122	^{q}15	^{a}123
12	*Staphylococcus simulans*	^{a}150	^{a}50	^{f}80	^{a}30	^{a}40
13	*Staphylococcus lentus*	^{a}300	^{b}280	^{a}290	^{m}110	^{a}290
14	*Listeria ivanovii*	^{a}170	^{a}110	^{j}130	^{a}10	^{a}80
15	*Penicillium*	^{a}164	^{a}146	^{a}162	^{a}10	^{c}153
16	*Rhizopus*	^{a}222	^{a}80	^{y}48	^{a}10	^{y}48
17	*Saccharomyces*	^{a}44	^{a}21	^{a}23	^{q}10	^{a}42

- (abcd...) لا توجد فروق معنوية بين المتوسطات التي تحمل حرفاً متشابهاً واحداً على الأقل في نفس السطر(p=0.05).
- الأحرف المتتالية تعني وجود فرق معنوي واحد مثل (ab) وكلما زاد الفرق زادت المعنوية مثل (ac) فرقان معنويان وهكذا
- العدد البكتيري الموجود في الجدول هو معدل لثلاث مكررات.

بينت النتائج أن المستخلص المائي لإكليل الجبل أدى إلى تثبيط إثني عشر من الأحياء الدقيقة. وضمن مجموعة البكتيريا السالبة لصبغة غرام كانت أفضل فعالية ضد بكتيريا *Citrobacter freundii* حيث إنخفض العدد البكتيري للشاهد من 116 خلية / مل إلى 52 خلية / مل مع المستخلص. وضمن البكتيريا الموجبة كانت أفضل فعالية له ضد بكتيريا *Staphylococcus simulans* حيث إنخفض العدد البكتيري للشاهد من 150 خلية / مل إلى 50 خلية / مل. وضمن مجموعة الفطريات من أعفان وخميرة كانت أفضل فعالية له ضد عفن *Rhizopus* حيث إنخفض العدد الكلي للشاهد من 222 خلية / مل إلى 80 خلية / مل. ثبطت الكراوية نمو تسعة من الأحياء الدقيقة. فضمن مجموعة البكتيريا السالبة لصبغة غرام كانت أفضل فعالية لها ضد بكتيريا *Enterobacter gergoviae* إذ إنخفض العدد البكتيري من 555 خلية / مل للشاهد إلى 310 خلية / مل، وضمن مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة غرام كانت أفضل فعالية لها ضد بكتيريا *Staphylococcus simulans* حيث إنخفض العدد البكتيري للشاهد من 150 خلية / مل إلى 80 خلية / مل. وضمن مجموعة الفطريات من أعفان وخميرة كانت أفضل فعالية لها ضد عفن *Rhizopus* حيث إنخفض العدد الكلي للشاهد من 222 خلية / مل إلى 48 خلية / مل.

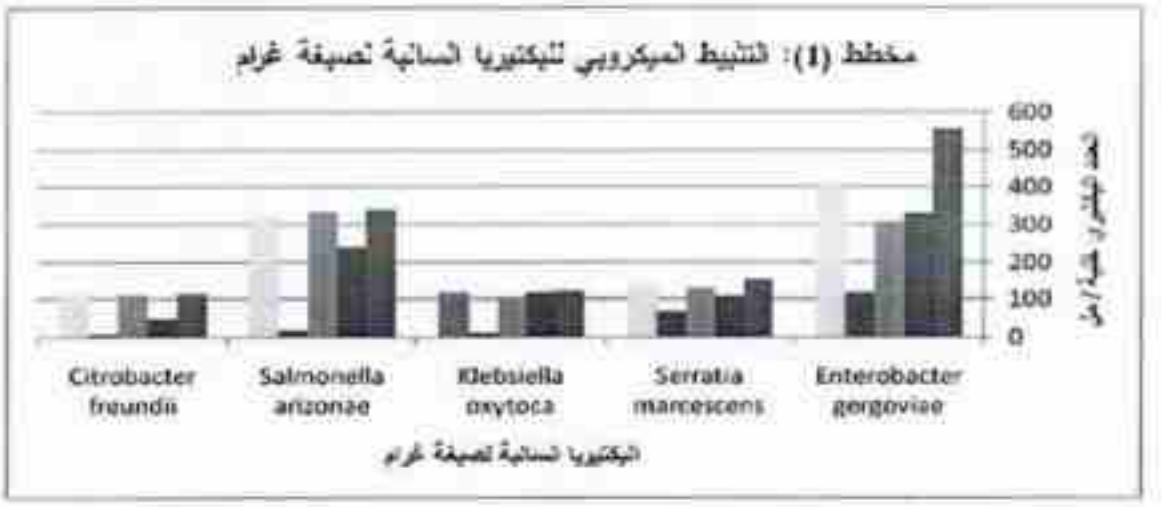
ثـــبـــط مستخلص الزعتر جميع الأحياء الدقيقة وبفروقات معنوية عالية جدا. فضمن مجموعة البكتيريا السالبة لصبغة غرام كانت أفضل فعالية له ضد بكتيريا *Citrobacter freundii* إذ إنخفض العدد البكتيري من 116 خلية / مل للشاهد إلى 8 خلية / مل، وضمن مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة غرام كانت أفضل فعالية له ضد ثلاث من هذه البكتيريا هي: *Enterococcus hirae* و *Staphylococcus simulans* و *Listeria ivanovii* حيث إنخفض العدد البكتيري للشواهد على التوالي من 740 و 150 و 170 خلية / مل إلى 100 و 30 و 10 خلية / مل بإضافة المستخلص المائي للزعتر. وضمن

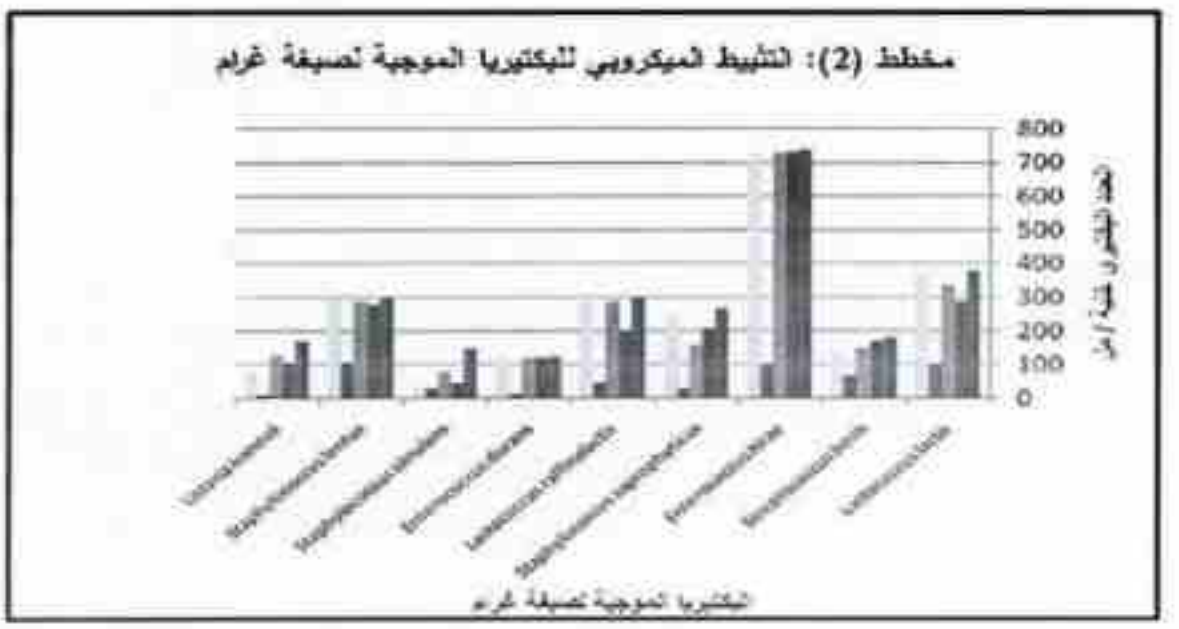
مجموعة الفطريات من أعفان وخميرة كانت أفضل فعالية له ضد عفني *Penicillium* و*Rhizopus* حيث إنخفض العدد الكلي للشواهد من 164 و222 خلية / مل إلى 10 خلية / مل على التوالي.

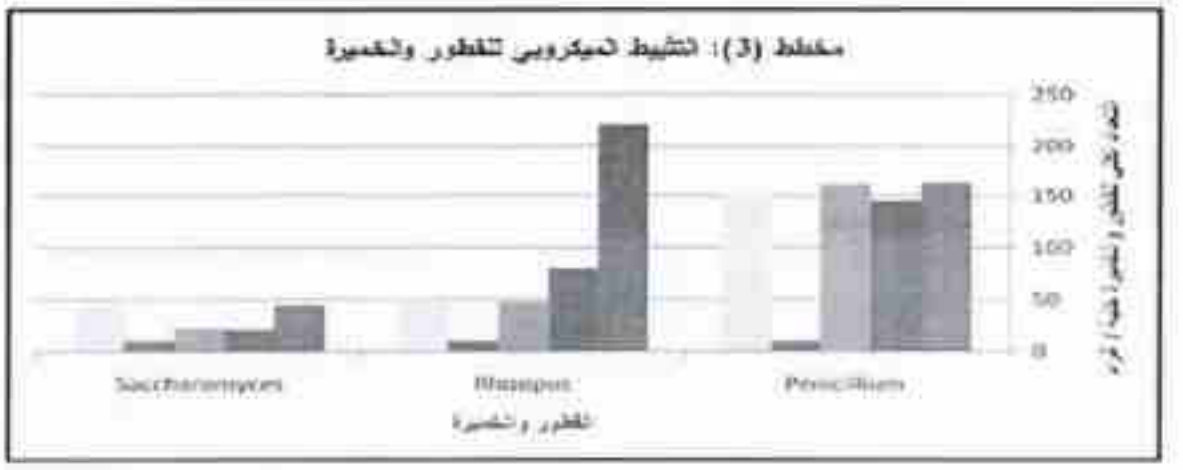
بينت النتائج أن فعالية الزنجبيل كانت معنوية ضد تسعة من الأحياء الدقيقة. فضمن مجموعة البكتيريا السالبة لصبغة غرام كانت أفضل فعالية له ضد بكتيريا *Enterobacter gergoviae* إذ إنخفض العدد البكتيري من 555 خلية / مل للشاهد إلى 410 خلية / مل عند إضافة مستخلصه المائي، وضمن مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة غرام كانت أفضل فعالية له ضد بكتيريا *Staphylococcus simulans* حيث إنخفض العدد البكتيري للشاهد من 150 خلية / مل إلى 40 خلية / مل. وضمن مجموعة الفطريات من أعفان وخميرة كانت أفضل فعالية له ضد عفن *Rhizopus* حيث إنخفض العدد الكلي للشاهد من 222 خلية / مل إلى 48 خلية / مل. ولوحظ أن الفروقات المعنوية متواضعة وغير فاعلة تطبيقيا على الأغلب.

لدى مقارنة تأثير المستخلصات المائية للنباتات المختبرة على المجموعات الميكروبية الثلاث يُلاحظ بأن الأعفان والخميرة كانت الأكثر حساسية حيث أنه وباستثناء مستخلص الزنجبيل فإن جميع المستخلصات الأخرى قامت بتثبيط الأعفان والخميرة وبقيم معنوية عالية. وتبين النتائج أن البكتيريا السالبة لصبغة غرام كانت أكثر حساسية لعملية التثبيط في حين أن البكتيريا الموجبة لصبغة غرام كانت الأكثر مقاومة لعملية التثبيط وهذا يطابق ما توصل اليه (Mounia et al., 2006). من جهة أخرى سجلت بكتيريا *Klebsiella oxytoca* أكبر مقاومة ضد المستخلصات المائية من بين البكتيريا السالبة لصبغة غرام حيث أن المعنوية الأكبر في التثبيط كانت لمستخلص الزعتر في حين أن بقية المستخلصات لم تثبطها أو ثبطت بقيم معنوية منخفضة. وعلى العكس من ذلك كانت بكتيريا *Enterobacter gergoviae* هي الأكثر حساسية لعملية التثبيط من بين هذه المجموعة، أما ضمن مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة غرام فقد بدت الأكثر مقاومة لعملية التثبيط كل من البكتيريا *Enterococcus hirae* و*Enterococcus durans* حيث لم يثبطها سوى مستخلص الزعتر. في حين أن بكتيريا *Listeria ivanovii* ثُبطت من جميع المستخلصات وبذلك تكون الأكثر حساسية لعملية التثبيط في هذه المجموعة.

وتوضح المخططات البيانية 1 إلى 3 نتائج عملية التثبيط لكل مجموعة من الأحياء الدقيقة.


مخطط (1): التثبيط الميكروبي للبكتيريا السالبة لصبغة غرام
600
500
400
300
200
100
0
Citrobacter freundii
Salmonella arizonae
Klebsiella oxytoca
Serratia marcescens
Enterobacter gergoviae
البكتيريا السالبة لصبغة غرام
التعداد الكلي للشاهد
التعداد الكلي لمستخلص إكليل الجبل
التعداد الكلي لمستخلص الكزبرة
التعداد الكلي لمستخلص الزعتر
التعداد الكلي لمستخلص الزنجبيل


مخطط (2): التثبيط الميكروبي للبكتيريا الموجبة لصبغة غرام
800
700
600
500
400
300
200
100
0
البكتيريا الموجبة لصبغة غرام
التعداد الكلي للشاهد
التعداد الكلي لمستخلص إكليل الجبل
التعداد الكلي لمستخلص الكزبرة
التعداد الكلي لمستخلص الزعتر
التعداد الكلي لمستخلص الزنجبيل


مخطط (3): التثبيط الميكروبي للفطور والخميرة
250
200
150
100
50
0
Saccharomyces
Rhizopus
Penicillium
الفطور والخميرة
التعداد الكلي للشاهد
التعداد الكلي لمستخلص إكليل الجبل
التعداد الكلي لمستخلص الكزبرة
التعداد الكلي لمستخلص الزعتر
التعداد الكلي لمستخلص الزنجبيل

5. الإستنتاجات:

1. تم عزل وتشخيص مجموعة متباينة من الأحياء الدقيقة من شرائح المرتديلا بعد فسادها تضمنت:

أ. بكتيريا سالبة لصبغة غرام وهي: *Enterobacter gergoviae* و*Serratia marcescens* و Klebsiella *oxytoca* و *Salmonella arizonae* و *Citrobacter freundii*.

ب. بكتيريا موجبة لصبغة غرام وهـــي: *Listeria ivanovii* و*Staphylococcus saprophyticus* و *Streptococcus bovis* و *Lactococcus lactis* و *Enterococcus hirae* و *Lactococcus raffinolactis* و *Enterococcus durans* و *Staphylococcus Lentus* و *Staphylococcus simulans*.

ت. عفن *Penicillium* وعفن *Rhizopus* وخميرة *Saccharomysis*

2. تفوق المستخلص المائي للزعتر على جميع المستخلصات في تثبيط الاحياء الدقيقة حيث ثبطها جميعا وانفرد بتثبيط كل من بكتيريا *Enterococcus hirae* و *Enterococcus durans*. يليه مستخلص إكليل الجبل فالكراوية، بينما بينت النتائج بوضوح ضعف المستخلص المائي للزنجبيل في تثبيط هذه الاحياء الدقيقة.

6. التوصيات:

بناء على معطيات نتائج تأثير المستخلصات المائية في تثبيط الأحياء الدقيقة المعزولة من شرائح المرتديلا المستهلكة في السوق الأردنية نوصي:

1. إستخدام المستخلص المائي للزعتر في مجال حفظ شرائح المرتديلا في المرتبة الأولى ويليه المستخلصات المائية لإكليل الجبل والكراوية والزنجبيل على التوالي.

2. متابعة الدراسات في هذا المجال باستخدام خليط المستخلصات المائية للأعشاب سابقة الذكر وتأثيرها التثبيطي في الأحياء الدقيقة المسببة لفساد شرائح المرتديلا.

المراجع العربية

- **الساعد علي، 1995- المواد المضافة للأغذية: الاستعمالات والإيجابيات والسلبيات**. الطبعة الأولى، منشورات الجامعة الأردنية، عمان، الأردن، 330 صفحة
- **البلداوي عبد الحميد عبد المجيد، 2009- أساليب الاحصاء للعلوم الاقتصادية وادارة الاعمال مع إستخدام برنامج SPSS**. الطبعة الأولى، الاردن، 442 صفحة.

References

- ABBAS S. M.; KADIR A. H., 2004- **Antimicrobial effect of water extract of sumac (Rhus coriaria L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens.** *Inter. J.l of Food Microbiology*, (97) 1. 63-69
- ADELEYE A. ; OGUNNIYI A. ; OMONIGBEHIN A., 2003- **Antimicrobial activity of some local herbs on common skin pathogens.** *Bioscience Research Communications* (15) 1, 231-236
- AGAOGLU S. ; DOSTEIL N. ; ALEMDAR S., 2007- **Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry.** *Bulletin of Vet. Institute of Pulawy*, (51) , 53-57.
- ALASSAF A. K., 2003- **Studying The effect of garlic , coriander and paprika on some properties of frankfurter** . Ms. Thesis. University of Jordan
- ALMANSI A., 2003- **The effect of grilling and frying on the chemical , sensory and microbial properties of frozen frankfurter and kebab**. Ms. Thesis. University of Jordan .
- BAM., 2003- **Bacteriological Analytical Manual**, U.S. FDA. U.S.A.
- BREMMESS L., 1994- **The Complete Book of Herbs: A Practical Guide to Growing and Using Herbs.** 5th ed. ISBN.
- BRITTON J.; Kircher, T., 1998 - **Herbal Remedies** – 1st ed, Marshall Editions. ISBN
- CHEN J. C.; HUANG S. L.; WU S. C.; KUO T. Y.; HSIANG C. Y., 2007- **Ginger and its bioactive component inhibit enterotoxigenic Escherichia coli heat-labile enterotoxin-induced diarrhea in mice.** *J. of Agri. & Food Chem. (55) 21, 8390–8397.*
- DUARTE, G., VAS-VELHO M., CAPELL C. AND GIBBS P., 1999 - **Efficiency of four secondary enrichment protocols in differentiation and isolation of Listeria spp. and Listeriamonocytogenes from smoked fish processing chains** . *International J. of Food Microbiology* (52) 3, 163-168.
- FARRELL K. T., 1990- **Spices, condiments and seasonings.** 2nd ed. Van Nostrand
- FEINER G., 2006- **Meat products handbook, Practical science and technology, Woodhead Publishing Limited**. First published , U.S.A.
- GERHARDT U.; SCHROTER A.; 1983- **Rosmarinic acid, an antioxidant occurring naturally in herbs. Fleischwirtschaft** (63) 1628–1630.
- GOULD G. W., 1995- **Overview In: New methods of food preservation**, Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- GULMEZ M. ; Vatansever L., 2006- **The effect of water extract of sumac (Rhus coriaria L.) and lactic acid on decontamination and shelf life of raw broiler wings**. Poultry Science (85) , 1466 – 1471
- GUNTER H.; Peter H.,2007- **Meat Processing Technology for Small to Medium Scale Products**. Bangkok.
- ICMSF., 1980- **Microbial Ecology of Foods, International Commission on Microbiological Specifications of Foods** , U.S.A.
- ICMSF., 1986- **Microorganisms in Foods , International Commission on Microbiological Specifications of Foods** , 2nd ed, Canada.
- IFST. Institute of Food Science and Technology., 1993- **Shelf life of food , Guidelines for its determinations and Prediction** . London.
- ISO 10272-1, 2001- **International standard for Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp.**, 1st ed.
- ISO 11290-1, 2004- **International standard for enumeration of *Listeria monocytogenes***, 1st ed.
- ISO 11290-2,1998/2004- **International standard for enumeration of *Listeria monocytogenes***, 1st ed.

- ISO 16654 , 2001- **International standard for Horizontal method for the detection of *Escherichia coli O157***, 1st ed.
- ISO 18593 ,2004- **International standard for Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs**, 1st ed.
- ISO 4831 , 2006- **International standard for Horizontal methods for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique**, 3rd ed.
- ISO 4833.2003- **International standard for Colony-count technique at 30 °C** , 3rd ed.
- ISO 6579, 2002- **International standard for detection of *Salmonella spp***, 4th ed 2002.
- ISO 6888-1,2003- **International standard for enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)**, 1st ed.
- ISO 7937,2004- **International standard for enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 °C**, 3rd ed.
- ISO 7937,2004- **International standard for Horizontal method for enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique**, 3rd ed.
- JEGFA ., 1994- **Summary of Evaluations Preformed by the Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives** , U.S.A.
- KIKUZAKI H.; KAWASAKI Y.; NAKATANI N.; 1994- **Structure of the antioxidative compounds in ginger, In Food phytochemicals for cancer prevention II teas, spices, and herbs**. ACS Symposium Series (547) 237–247.
- KISS. I. 1984- **Testing methods in food microbiology**, U.S.A., 1984.
- LAGOURI V.; BOSKOU D., 1995- **Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices**. Amsterdam.
- LESLY B., 1994 – **The complete book of herbs a practical guide to growing and using herbs.** 5th ed. , Penguin group, U.S.A., 288 P.
- LUCK E.; JAGER M., 1997- **Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects. Berlin**, Germany.
- MICHAEL P.; DOYLE F.,1989- **Bacterial Pathogens**, U.S.A.
- MOUNIA O.; STEPHANE C.; LINDA S.; MONIQUE L., 2006 - **Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat** .J. Meat Science (73), 236-244.
- PETER K. V., 2001- **Handbook of herbs and spices 1**. CRC Press, New York, 326.
- RAY B.,2001- **Fundamental food Microbiology**, 2nd ed. New York.
- REIST J., 2004- **The Effectiveness of Preservatives in Homemade Dog Treats**. California State Science Fair Journal, (4) 4-6.
- ROBERT S.; ELLEN H.,1995- **Introduction to food- born Fungi**, 4th ed. Netherlands.
- SHAW N., 2000- **Herbalism: An Illustrated Guide**. 1st ed., ISBN.
- SHERIDAN C. J.; LYNDALL S. G., 2001- **SPSS Analysis without Anguish,** Australia.
- SIVAROOBAN N.; NAVAM S.; HETTIARACHCHY; MICHAEL G. J.; 2006- **Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters**. Vol. 71, Nr. 2, 2006— Journal of Food Science,(71) 2, 40-44.
- SNYDER P. O., 2009- **Antimicrobial Effects of Spices and Herbs. Hospitality Institute of Technology and management**. Canada.
- UMMC. University of Maryland Medical Center., 2006- **Ginger**. Maryland.
- ZOHARY D.; HOPF M., 2000- **Domestication of plants in the Old World**, 3rd edition, Oxford, U.S.A.

A Study of Antimicrobial Activity Between Microorganisms Isolated From Jordanian Sliced Mortadella and Local Water Extracts Herbs

Nasr Ahmed Hassanein[1] Abdul Hakim Aziziyeh[2] Saleh Abu al-Kheir[3]

Abstract

The aim of this research was to study inhibition of microorganisms isolated from corrupted sliced mortadella in Jordan using water extracts of four local aromatic herbs. The aqueous extracts of thyme, ginger, caraway and rosemary prepared from dry herb by 1:10 (herbs: water) then sterilized using microbial filtration papers. Detection of inhibition effects was done by Comparing total microbial count without the addition of water extracts herbs with total microbial count with the addition of water extracts herbs. Isolation of microorganisms done through a wide microbial analysis detect five types of gram -ve bacteria which are: *Enterobacter gergoviae, Serratia marcescens, Klebsiella oxytoca, Salmonella arizonae* and *Citrobacter freundii*. And nine gram positive bacteria which are: *Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus simulans, Staphylococcus Lentus, Streptococcus bovis, Lactococcus lactis, Lactococcus raffinolactis, Enterococcus durans, Enterococcus hirae* and *Listeria ivanovii. Penicillium, Rhizopus and Saccharomysis* funji was isolated too. Statistical analysis using Analysis of variance (ANOVA) was conducted using general linear model. The least significant difference (LSD) procedure was used to compare means and significant mean differences among the treatments. Significant differences were determined at $P < 0.05$ showed that thyme extract have the best effect, followed by rosemary and caraway extracts, while effectiveness of ginger extract was the least.

Key words: Inhibition of microorganisms, Water extracts herbs, Jordanian sliced mortadella.

(1)Ph.D. student –Dep. of Food Science – Fac. of Agri. University of Damascus.

(2), (3). Professor – Dep. of Food Science – Fac. of Agri. University of Damascus.