



جامعة دمشق

كلية الزراعة

قسم علوم الأغذية

دراسة الأثر المثبط لبعض الزيوت العطرية في بعض الأحياء الدقيقة

Studying The Antimicrobial Effect Of Some Essential Oils On Some Microorganisms

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في علوم الأغذية

إعداد

م. محمد باسل الدخل الله

إشراف

المشرف المشارك

د.أنور الحاج علي

أستاذ في قسم علوم الأغذية

المشرف العلمي

د.صباح يازجي

أستاذ في قسم علوم الأغذية

بطاقة شكر

لا بد لي في البداية بان أتقدم بالشكر لصاحب الفضل لله سبحانه وتعالى الذي اكرمني

بإتمام هذا العمل

كما أتوجه بالشكر الكبير إلى الأستاذة الدكتور صباح يازجي والأستاذ الدكتور أنور

الحاج علي الذين سانداني بكل خطوة خطيتها فكانا بصبرهما وتوجيههما خير

الناصح والمعلم . . .

فشكرا جزيلًا لحسن الاشراف وطيب المعاملة وصدق العمل..

كما أخص بالشكر الزملاء في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، إلى من سعدت بحمिल

مساعدهتهم وصدق معاملتهم، شكرا فقد كنتم خير عون لي . .

الملخص:

استخلص زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين بطريقة التقطير البخار، وحللت مكوناتهما باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية المزود بمطياف الكتلة (GC-MS)، فتبين أن زيت الزعتر يتكون من 11 مركباً عطرياً، حيث يشكل كل من الكارفادول والثايمول حوالي 73% و9% على التوالي من مكونات زيت الزعتر العطري، وبلغت نسبة المركبات العطرية المثبطة للأحياء الدقيقة في زيت الزعتر حوالي 90%، بينما تبين أن زيت إكليل الجبل العطري يتكون من 49 مركباً عطرياً منها مركبات α -pinene (12.25%)، Camphor (12.29%)، -1.8 Cineole (10.75%) و Borneol (8.89%)، وبلغت نسبة المركبات العطرية المثبطة لنمو الأحياء الدقيقة حوالي 42% فقط. حضرت التراكيز من 1-7% منهما، واختبر التأثير المثبط لهما في نمو مجموعة من البكتيريا موجبة وسالبة الغرام (*E.coli*، *Staphylococcus aureus*)، الفطور (*Pseudomonas aerogenosa*، *Salmonella typhi*، *Klebsiella pneumoniae*) ونوعين من الخمائر (*Fusarium sp* و *Penicillium digitatum*) ونوعين من الخمائر (*Candida albicans* و *Rhodotorolla glutinis*)، تبين أن التأثير المثبط للزيتين العطريين يتناسب طردياً مع تركيز الزيت المستخدم، وأظهرت بكتيريا *P.aerogenosa* أعلى مقاومة لتأثير الزيتين العطريين، وأظهرت بكتيريا *S.aureus* أعلى حساسية للتأثير المثبط لزيت الزعتر العطري، بينما كانت بكتيريا *S.typhi* و *K.pneumoniae* هي الأكثر حساسية لتأثير زيت إكليل الجبل العطري. أظهر زيت الزعتر العطري تأثيراً مثبطاً لنمو جميع الفطور والخمائر المدروسة، حيث كان فطر *Fusarium sp* أكثرها حساسية وكانت خميرة *R.glutinis* أكثرها مقاومة لتأثيره، بينما لم يسجل أي تأثير مثبط لزيت إكليل الجبل العطري في نمو كل من فطر *P. digitatum* وخميرة *R. glutinis* وكان تأثيره ضعيفاً في خميرة *C. albicans* حيث لم يسجل أي تأثير مثبط إلا بتركيز 5%، وأظهر فطر *Fusarium sp* حساسية عالية لتأثيره. اختبر تأثير كل من الزيتين المدروسين في إطالة فترة حفظ اللحم المبرد، حيث استخدم تركيزي 3% و 5% لكل منهما وتمت معاملة اللحم بالتركيزين السابقين، وتمت مراقبة التعداد الكلي لمدة 12 يوماً لتحديد مدى صلاحية اللحم للاستهلاك عن طريق عدم مخالفته للمواصفة القياسية السورية رقم 2007-2179 التي تنص على أن التعداد العام للأحياء الدقيقة يجب أن لا يتجاوز 10×10^6 خلية/غ، أظهر زيت الزعتر بتركيز 5% القدرة الأعلى على حفظ اللحم حيث وصلت فترة حفظه لأحد عشر يوماً، ولم تتجاوز فترة حفظ اللحم سبعة أيام عند استخدام زيت إكليل الجبل بتركيز 3%.

Abstract

The essential oils of thyme and rosemary were extracted by the steam distillation method. First, its components were analyzed by Gas Chromatography supplied with Mass Spectrometer unit (GC-MS). It is found that Thyme oil consists of 11 aromatic compounds. Carvacrol and Thymol formed about 73% and 9%, respectively, of them. The percentage of aromatic compounds that inhibit microorganisms in thyme oil is 90%. While, rosemary oil consists of 49 aromatic compounds in which α -pinene (12.25%), Camphor (12.29%), 1,8-Cineole (10.75%) and Borneol (8.89%) take the highest levels. In this oil, The percentage of aromatic compounds that inhibit microorganisms formed only 42%. second, concentrations (1-7%) of both essential oils were prepared and its antimicrobial effects were tested on the growth of a group of bacteria positive and negative gram, namely (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Salmonella typhi*, *Klebsilla pneumonia*) and two kinds of fungus (*Penicillium digitatum* and *Fusarium sp*) and two kinds of yeasts (*Candida albicans* and *Rhodotorula glutins*). The results show that antimicrobial effect of both essential oils has a direct relationship with the concentrations of both oils. Bacteria *P. aerogenosa* shows the highest resistance against the inhibition of both oils. Conversely, *S. aureus* and *Sal. typhi* demonstrate the lowest resistance to Thyme and Rosemary oil, in order. Furthermore, Thyme oil inhibits the growth of the whole studied fungus and yeasts. *Fusarium sp* was the most sensitive and *R. glutins* was the most resistant to the Thyme oil effect. The rosemary oil does not show any antimicrobial effect on the growth of both *P. digitatum* and *R. glutins*. Moreover, It has a weak effect on *C. albicans*. Third, both essential oils were used to prolong the shelf life of refrigerated meat which were treated by only two concentrations (3%, 5%) of both essential oils. Then, the total count of microorganisms was monitored for 12 days and it was compared with Syrian standard specification No: 2179 - 2007 to determine the suitability of meat for consumption, which adverts that the total count must not exceed 1×10^6 cell/g. Thyme oil (5%) shows the highest ability to prolong the shelf life of refrigerated meat reaching 11 days. While, rosemary oil (3%) has the lowest one with 7 days only.

فهرس المحتويات

الصفحة

1	1- المقدمة
3	2- أهداف البحث
4	3- الدراسة المرجعية
5	3-1- دور بعض النباتات في حفظ الأغذية
5	3-2- آلية تأثير الزيوت العطرية
7	3-3- أهم المركبات العطرية التي تدخل في تركيب الزيوت العطرية المختلفة
10	3-4- النباتات المستخدمة في الدراسة
10	3-4-1- نبات الزعتر
10	3-4-1-1- الوصف النباتي
11	3-4-1-2- مكونات زيت الزعتر العطري
14	3-4-1-3- التأثير المثبط للأحياء الدقيقة لزيت الزعتر
19	3-4-2- نبات إكليل الجبل
19	3-4-2-1- الوصف النباتي
19	3-4-2-2- مكونات زيت إكليل الجبل العطري
21	3-4-2-3- التأثير المثبط للأحياء الدقيقة لزيت إكليل الجبل
25	3-5- تلوث الغذاء بواسطة الأحياء الدقيقة والمخاطر الناجمة عنها
25	3-5-1- بعض أنواع البكتيريا المسببة للتسمم الغذائي

25	<i>Salmenella typhi</i> -1-1-5-3
26	<i>Echerichia coli</i> -2-1-5-3
26	<i>Klebsilla pneumonia</i> -3-1-5-3
27	<i>Staphylococcus aureus</i> -4-1-5-3
28	<i>Pseudomonas aerogenosa</i> -5-1-5-3
29	2-5-3 الفطور والخمائر المستخدمة في الدراسة
29	<i>Penicillium digitatum</i> -1-2-5-3
30	<i>Fusarium sp</i> -2-2-5-3
31	<i>Candida albicans</i> -3-2-5-3
31	<i>Rhodotorula glutinis</i> -4-2-5-3
31	6-3 استخدام الزيوت العطرية في حفظ أنواع مختلفة من الأغذية
34	4- الجزء العملي
34	1-4- المواد
34	1-1-4- المواد والأجهزة المستخدمة
34	2-1-4- النباتات المدروسة
34	1-2-1-4- جمع النباتات المدروسة
34	2-2-1-4- تجفيف النباتات المدروسة
35	3-1-4- العزلات الميكروبية المستخدمة في الدراسة
35	1-3-1-4- العزلات البكتيرية
35	2-3-1-4- عزلات الفطور والخمائر

35	2-4- الطرائق
35	4-2-1- استخلاص الزيوت العطرية الطيارة للنباتات المدروسة
36	4-2-2- التعرف على مكونات الزيوت العطرية بواسطة جهاز (GC-MS)
36	4-2-3- الزرع الميكروبي (طريقة الأقراص)
36	4-2-4- استخدام الزيوت العطرية في حفظ اللحم
37	4-3- التحليل الإحصائي
39	5- النتائج والمناقشة
39	5-1- نتائج تحليل المكونات العطرية
39	5-1-1- مكونات زيت الزعتر العطري
41	5-1-2- مكونات زيت إكليل الجبل العطري
44	5-2- نتائج دراسة التأثير المثبط للزيوت العطرية
44	5-2-1- نتائج دراسة التأثير المثبط للزيوت العطرية في نمو البكتيريا
47	5-2-1-1- توزيع التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط البكتيريا
49	5-2-1-2- تأثير نوع الزيت في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية
50	5-2-1-3- تأثير تركيز الزيت في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية
50	5-2-1-4- تأثير نوع البكتيريا في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية
51	5-2-2- نتائج دراسة التأثير المثبط للزيوت العطرية في الفطور الخمائر
54	5-2-2-1- تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط الفطور والخمائر
56	5-2-2-2- تأثير نوع الزيت في قطر تثبيط نمو الفطور والخمائر
57	5-2-2-3- تأثير تركيز الزيت في قطر تثبيط الفطور والخمائر

57	4-2-2-5- تأثير نوع الفطر والخميرة في قطر تثبيط نموها
58	3-5- نتائج دراسة تأثير الزيوت العطرية في فترة حفظ اللحم المبرد
59	1-3-5- نتائج دراسة تأثير الزيوت العطرية في التعداد الكلي للحم المبرد
60	1-1-3-5- تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة
61	2-1-3-5- تأثير نوع الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة
62	3-1-3-5- تأثير تركيز الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة
62	4-1-3-5- تأثير فترة التخزين في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة
64	6- الاستنتاجات
65	7- المقترحات
66	8- المراجع الأجنبية
76	9- المراجع العربية
77	10- ملحق الصور

فهرس الجداول

- 7 **الجدول(1)** يوضح أهم المركبات العطرية المكونة للزيوت العطرية حسب الـ USDA
- 10 **الجدول(2)** يوضح أهم الخواص الطبية للتربينات الشائعة
- الجدول(3)** يوضح الصيغ الكيميائية لمركبي الكارفاكروول والثايمول (Lambret et al, 2001) 11
- الجدول(4)** يوضح المكونات الأساسية لزيت الزعتر العطري حسب الباحث Grigore عام 2010 13
- الجدول(5)** يوضح مدى اختلاف نسب مكونات زيت الزعتر المستخلص من نباتات جمعت من مناطق مختلفة 14
- الجدول(6)** يوضح تأثير بعض المكونات النباتية في *Escherichia coli* و *Salmonella typhimorium* 15
- الجدول(7)** يوضح أقطار التنشيط لبعض المواد المطهرة والكارفاكروول 16
- الجدول(8)** يوضح مكونات زيت إكليل الجبل العطري ونسبتها حسب الباحث Jiang عام 2010 20
- الجدول(9)** يوضح أهم مكونات زيت إكليل الجبل العطري ونسبتها حسب Heravi عام 2010 20
- الجدول(10)** يوضح أقل تركيز مثبط من زيت إكليل الجبل و α -Pinene و Cineole-1,8 لنمو البكتيريا 22
- الجدول(11)** يوضح التأثير المثبط لبعض مكونات زيت إكليل الجبل العطري في نمو بعض البكتيريا الممرضة 23

الجدول(12)يوضح أقل تركيز مثبت من زيت إكليل الجبل العطري لنمو بعض أنواع	
الخمائر	24
الجدول(13) يوضح النباتات العطرية المستخدمة في الدراسة	34
الجدول (14) يوضح الأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة	35
الجدول (15) يوضح أنواع الفطور والخمائر المستخدمة في الدراسة	35
الجدول (16) يوضح النسب المئوية لمكونات زيت الزعتر العطري	39
الجدول (17) يوضح النسب المئوية لمكونات زيت إكليل الجبل العطري العطري	41
الجدول (18) يوضح متوسطات أقطار التثبيط لزيت الزعتر للبكتيريا المدروسة(مم)	44
الجدول (19) يوضح متوسطات أقطار التثبيط لزيت إكليل الجبل للبكتيريا المدروسة	
(مم)	46
الجدول (20) يوضح تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط البكتيريا	47
الجدول (21) يوضح متوسطات أقطار التثبيط لزيت الزعتر للفطور والخمائر المدروسة	
(مم)	52
الجدول (22) يوضح متوسطات أقطار التثبيط لزيت إكليل الجبل للفطور والخمائر	
المدروسة(مم)	53
الجدول (23) يوضح تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط الفطور والخمائر	
	55
الجدول (24) يوضح متوسطات العد الكلي لعينات اللحم المعامل بالزيت والشاهد	59
الجدول (25) تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة	60

فهرس الأشكال

- الشكل (1) يوضح صيغ أهم المركبات العطرية حسب (Burt, 2004) (Friedman et al, 2002) 9
- الشكل (2) يبين نتائج تحليل مكونات زيت الزعتر العطري باستخدام (GC-MS) 40
- الشكل (3) يبين نتائج تحليل مكونات زيت إكليل الجبل باستخدام (GC-MS) 43
- الشكل (4) يوضح توزيع التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط البكتيريا 48
- الشكل (5) يوضح تأثير نوع الزيت في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية المدروسة 49
- الشكل (6) يوضح تأثير تركيز الزيت في قطر التثبيط للأنواع البكتيرية المدروسة 50
- الشكل (7) يوضح تأثير نوع البكتيريا في قطر تثبيط نمو الأنواع البكتيرية 51
- الشكل (8) يوضح تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط الفطور والخمائر 55
- الشكل (9) يبين تأثير نوع الزيت في تثبيط الفطور والخمائر 56
- الشكل (10) يبين تأثير تركيز الزيت في قطر التثبيط للأنواع البكتيرية المدروسة 57
- الشكل (11) يبين تأثير نوع الفطر في قطر تثبيط نمو الفطور والخمائر 58
- الشكل (12) يبين تأثير نوع الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة 61
- الشكل (13) يبين تأثير تركيز الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة 62
- الشكل (14) يبين تأثير فترة التخزين في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة 63

1- المقدمة:

تعددت المواد الحافظة المستعملة في حفظ الأغذية ونظريات تأثيرها، وتعتبر المواد الكيميائية التركيبية أكثرها استخداماً وشيوعاً لحفظ مختلف أنواع المواد الغذائية. اتجه الباحثون في الآونة الأخيرة إلى الاستعاضة عن المواد الحافظة التركيبية بمواد أخرى مستخرجة من مصادر طبيعية، وذلك بسبب اكتشاف بعض التأثيرات الصحية الجانبية التراكمية التي كانت مجهولة سابقاً، ولهذا الغرض أجريت الأبحاث لدراسة الخواص المثبطة لبعض المركبات الطبيعية لنمو الأحياء الدقيقة ولاسيما الممرضة منها، تمهيداً لدراسة إمكانية استخدامها في حفظ الأغذية.

تعتبر الزيوت العطرية المستخرجة من النباتات البرية بطريقة التقطير البخار غنية بالمركبات العطرية، التي تحتوي نسبة عالية من المركبات الفينولية والتربينية، حيث تمتلك خواص مثبطة لنمو الأحياء الدقيقة الممرضة والمسببة للفساد الغذائي والتسممات، وأظهرت الأبحاث قدرة كبيرة لمعظم الزيوت العطرية على تثبيط نموها، لذلك ركزت الكثير من الأبحاث الحديثة على الاستفادة من هذه الخاصية الهامة في حفظ الأغذية، بهدف الاستعاضة بشكل كامل عن المواد الحافظة الكيميائية التركيبية، أو استخدامها كوسيلة مساعدة لطرائق الحفظ التقليدية كالتبريد والتشعيع.. إلخ.

يساهم هذا النوع من الأبحاث في الحد من استخدام المواد الحافظة التركيبية الكيميائية، وبالتالي الحد من الأضرار الصحية التراكمية الناتجة عن استخدامها بكثافة عالية، إضافة إلى إمكانية استخدامها لإطالة فترة حفظ وتداول بعض المواد الغذائية التي تتميز بفترة حفظ قصيرة نسبياً.

تعرف معظم الزيوت العطرية على أنها مواد (GRAS General Recognized As safe)، يمكن استخدامها بأي تركيز في الأغذية دون التسبب بأي تسممات مباشرة أو أي تأثيرات جانبية وتراكمية على صحة الإنسان، اختير نباتي الزعتر وإكليل الجبل، حيث أن هذان النباتان متوفران بشكل بري في منطقة المتوسط وبالتالي لا يوجد تكلفة كبيرة لزراعة هذه النباتات الأمر الذي يجعل استخدامها اقتصادياً، علماً بأنه تتم زراعة عدة أنواع من النباتات العطرية الطبية بشكل حقل في كثير من المناطق في سوريا لاستخدامات مختلفة، وهما آمان صحياً كونهما يستخدمان كمادتين منكهتين في بعض الأغذية دون وجود أي تأثيرات جانبية على صحة الإنسان.

ومن هنا أتت أهمية هذا البحث في دراسة تأثير الزيوت العطرية لبعض النباتات في نمو بعض السلالات الجرثومية، والتي يمكن أن توجد أو تلوث أنواع عديدة من الأغذية مسببة فسادها، إضافة لاستخدامها كطريقة مساعدة لحفظ اللحوم المبردة، بهدف إطالة فترة حفظها المبرد التي لا تزيد عن أربعة أيام.

2- أهداف البحث:

- أ- الحصول على خلاصات نقية من الزيوت العطرية لكل من الزعتر وإكليل الجبل المحليين بطريقة التقطير البخار.
- ب- تحديد مكونات الزيتين العطريين المستخلصين باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية المزود بجهاز مطياف الكتلة (GC-MS).
- ج- دراسة التأثير المثبط لزيتي الزعتر وإكليل الجبل العطري في نمو الأحياء الدقيقة الممرضة والمسببة للفساد الغذائي.
- د- دراسة إمكانية استخدام كل من الزيتين العطريين في إطالة مدة حفظ اللحم المبرد.

3- الدراسة المرجعية:

3-1- دور بعض النباتات في حفظ الأغذية:

اتباع الإنسان طرائق عديدة في حفظ الأغذية، حيث أنه استخدام الملح في حفظ اللحوم والخضار، والسكر لحفظ الفواكه، والكحول لحفظ بعض أنواع العصائر، واستخدام تقانة التجفيف والتحميض. كما اكتشف التأثير الحفظي للبهارات والتوابل للأغذية، وبالتالي اعتمد على بعضها كمواد حافظة، كما تم اكتشاف التأثير القاتل للبكتيريا والفطور والخمائر لكل من الثوم والبصل والزعتر والتي استخدمت لحفظ الأغذية من الفساد. استخدمت بعض النباتات العطرية في مكافحة الأوبئة كالطاعون والكوليرا ومعالجة الحروق والجروح نتيجة لامتلاكها خواص مضادة للميكروبات والفيروسات. (Valent, 1986)(Tisserand, 1977)

تمتلك بعض الزيوت العطرية مركبات عديدة ذات تأثير مثبط، لنمو الأحياء الدقيقة موجبة وسالبة الغرام (Deans & Ritchi, 1987)، وقد أشارت الأبحاث إلى أن البكتيريا موجبة الغرام أكثر حساسية لتأثيرها، وبينت معظم الأبحاث أن الفطور والخمائر أكثر حساسية من البكتيريا (Nikaido, 1996) (Smith *et al*, 1998).

تعود الخواص المثبطة للزيوت العطرية بشكل أساسي لمحتواها من المواد الفينولية والتربينية (Conner, 1993)، ومن أهم المواد المثبطة لنمو الأحياء الدقيقة هي الكارفافكروول والثايمول (Burt, 2004)، كما افترض الباحث Deans وزملاؤه أن النشاط المضاد للميكروبات القوي للزيوت العطرية يعود لمحتواها العالي من Monoterpenes، Eugenol، Cinnamic aldehyd و Thymol. (Deans *et al*, 1995)

تختلف الزيوت العطرية فيما بينها بقدرتها على تثبيط نمو الأحياء الدقيقة المختلفة، وإضافة لذلك نجد هذا الاختلاف ضمن الزيت الواحد المتحصل عليه من مناطق مختلفة، وهذا يعود إلى الاختلاف في نسب مكونات الزيت العطري مثل محتواه من المواد الفينولية والتربينية والكحولية والألدهيدات. (Bruni *et al*, 2003) (Sacchettie *et al*, 2005) (Conner, 1993)

تعرف البهارات على أنها مركب طبيعي أو خليط من المركبات الطبيعية التي تم الحصول عليها من بذور أو ثمار أو أزهار أو جذور أو أوراق نباتات مختلفة وتضاف

للأغذية بهدف الحصول على طعم أو نكهة أو رائحة أو لون. (Turkish Food Codex,)
(2000)

2-3- آلية تأثير الزيوت العطرية:

توجد نظريات وآراء متعددة حول آلية تأثير الزيوت العطرية في نمو الأحياء الدقيقة، فقد افترض أن للزيوت العطرية تأثير في عدة أنظمة أنزيمية في الخلية الميكروبية والمتضمنة لإنتاج الطاقة وتصنيع المركبات البنوية الأساسية في الخلية، فعندما يجتاز المركب الفينولي جدار الخلية يتفاعل أو يرتبط مع بروتينات وأنزيمات الغشاء مما يسبب تعطيل عملها. (Conner & Beuchat, 1984)، ووجد أن مركبات Thymol و Eugenol و Carvacrol توقف نشاط الأنزيمات الأساسية في الخلية وتحدث تفاعل مع غشاء الخلية أو أنها تحدث اضطرابات في وظيفة المركبات الجينية في الخلية. (Davidson, 2001)، تساعد الخواص المحبة للدهون Lipophilic للفينولات والتربينات الموجودة بتركيز عالي في الزيوت العطرية على الارتباط بغشاء الخلية وتعطيل عمله مسببة نزوب الطاقة (Conner, 1993)، ويعتقد في فرضية مشابهة أن الزيوت العطرية تظهر أنظمة مختلفة في نشاطها ضد السلالات البكتيرية مثل ارتباطها بالطبقة المضاعفة الفوسفوليبيدية في غشاء الخلية مما يسبب زيادة نفاذية الغشاء وفقدان مكونات الخلية أو تخريب الأنزيمات من بينها الأنزيمات المسؤولة عن إنتاج الطاقة وتصنيع المكونات البنوية الأساسية في الخلية. (Sikkema et al, 1995) (Kim et al, 1995) (Davidson,) (1997) (Lambert et al, 2001)

يختلف تأثير الزيوت العطرية في البكتيريا موجبة الغرام عنه في السالبة الغرام حيث وجد أن موجبة الغرام أكثر حساسية، (Harpaz et al, 2003) (Delaquis et al,) (2002) حيث تحتاج البكتيريا سالبة الغرام إلى استخدام تراكيز أعلى من 1% لتثبيط نموها، وهذا يعود إلى طبيعة الجدار الخلوي للبكتيريا سالبة الغرام ذو الطبيعة المحبة للماء وهذا يعني نفاذ الجزيئات الصغيرة الذوابة في الماء فقط مما يمنع نفوذ الزيوت العطرية (المحبة للدهن) أو يعيق نفوذها بشكل كبير مما يزيد مقاومة البكتيريا السالبة الغرام (Nikaido, 1985) (&Vaara, 1996) وعلی الرغم من طبيعة الجدار الخلوي للبكتيريا السالبة الغرام فالمركبات المحبة للدهون ذات الوزن الجزيئي المنخفض يمكنها اختراق

الجدار الخلوي لها وتؤثر في تكاثرها وانتشارها في البيئة الغذائية. (Helander et al, 1998)

لوحظ أيضاً انخفاض في التأثير المثبط للزيوت العطرية في البيئات الطبيعية مقارنة معه في البيئات الصناعية، وهذا ما أشير إليه في بحث أجري لدراسة تأثير زيت الزعتر والقرنفل في فطر *Aspergillus flavus* في بيئة مرق الدكستروز وبيئة من رب البندورة حيث لوحظ انخفاض للتأثير المثبط في البيئة الطبيعية. (Omidbeygi et al, 2007)، كما افترض أن الزيوت العطرية تدمص على سطح الليبيدات، مما يقلل من تركيز الزيت العطري الحر في الوسط المائي للغذاء، وبالتالي تقليل التأثير المثبط، بالإضافة إلى أن انخفاض المحتوى المائي في الغذاء مقارنة مع الوسط الغذائي الصناعي يساهم في إعاقة وصول المضادات الميكروبية إلى المواقع المستهدفة في الخلية الميكروبية. (Smith et al, 2001) كما أن ارتباط المركبات الفينولية للزيت العطري بالبروتينات في الغذاء يقلل من التأثير المثبط للزيت العطري. (Ultee et al, 1998)

أشار بعض الباحثون إلى أن التبريد يلعب دوراً مساعداً لتأثير الزيوت العطرية المضاد لنمو الأحياء الدقيقة، كما في حالة زيت الزعتر والقرنفل و القرفة، حيث احتفظت هذه الزيوت بتركيزها المنخفضة المستخدمة اللازمة لتثبيط أو قتل البكتيريا، بينما لوحظ تأثير معاكس للتبريد عند استخدام زيت الغار وزيت جوزة الطيب، حيث كانت الفعالية على درجة حرارة 4 م° أقل منها على حرارة 35 م°، يعود السبب لحدوث تغيرات في الموقع الفعال لهذه الزيوت العطرية أو حدوث تبدلات في طبيعة الغلاف البكتيري، وبالتالي التقليل من نفاذية الزيوت لغلاف الخلية، وقد يعود التأثير لهذه الزيوت على حرارة 35 م° إلى تحرير الأجزاء الطيارة المثبطة على هذه الدرجة من الحرارة (Smith et al, 1998)، وفي بحث مشابه وجد أن التبريد قد يلعب دوراً مشجعاً أو معززاً للتأثير المثبط للزيوت العطرية كما في الميرمية أو قد لا يلعب هذا الدور كما في القرنفل وذلك عند استخدامهما كمضادين ميكروبين لنمو بكتيريا *Listriamonocytogenes*. (Ting & Deibel, 1992)

تشارك عدة عوامل مؤثرة في نشاط الزيوت العطرية كمضاد ميكروبي من أهمها النوع البكتيري، درجة الحرارة، الوسط الغذائي والحمولة الجرثومية الأولية. (Genana et al, 2008)

3-3- أهم المركبات العطرية التي تدخل في تركيب الزيوت العطرية المختلفة:

تختلف الزيوت العطرية فيما بينها بمحتواها من المركبات الكيميائية العطرية، وذلك حسب نوع الزيت العطري، كما تختلف مكونات الزيت العطري نفسه وذلك تحت تأثير عدة عوامل كالظروف البيئية المحيطة بالنبات (نوع التربة، توفر المياه، درجة الحرارة.. إلخ)، والطور النباتي المستخلص منه الزيت العطري (خضري، زهري..) وطريقة الاستخلاص للزيت. يمكن تقسيم مكونات الزيوت العطرية لثلاث مجموعات أساسية هي: الكحولات، الفينولات والتربينات، حددت الـ USDA عام 2004 بعض المركبات العطرية التي توجد في الزيوت العطرية المختلفة كما هو موضح في الجدول (1)

الجدول(1)يوضح أهم المركبات العطرية المكونة للزيوت العطرية حسب الـ USDA 2004

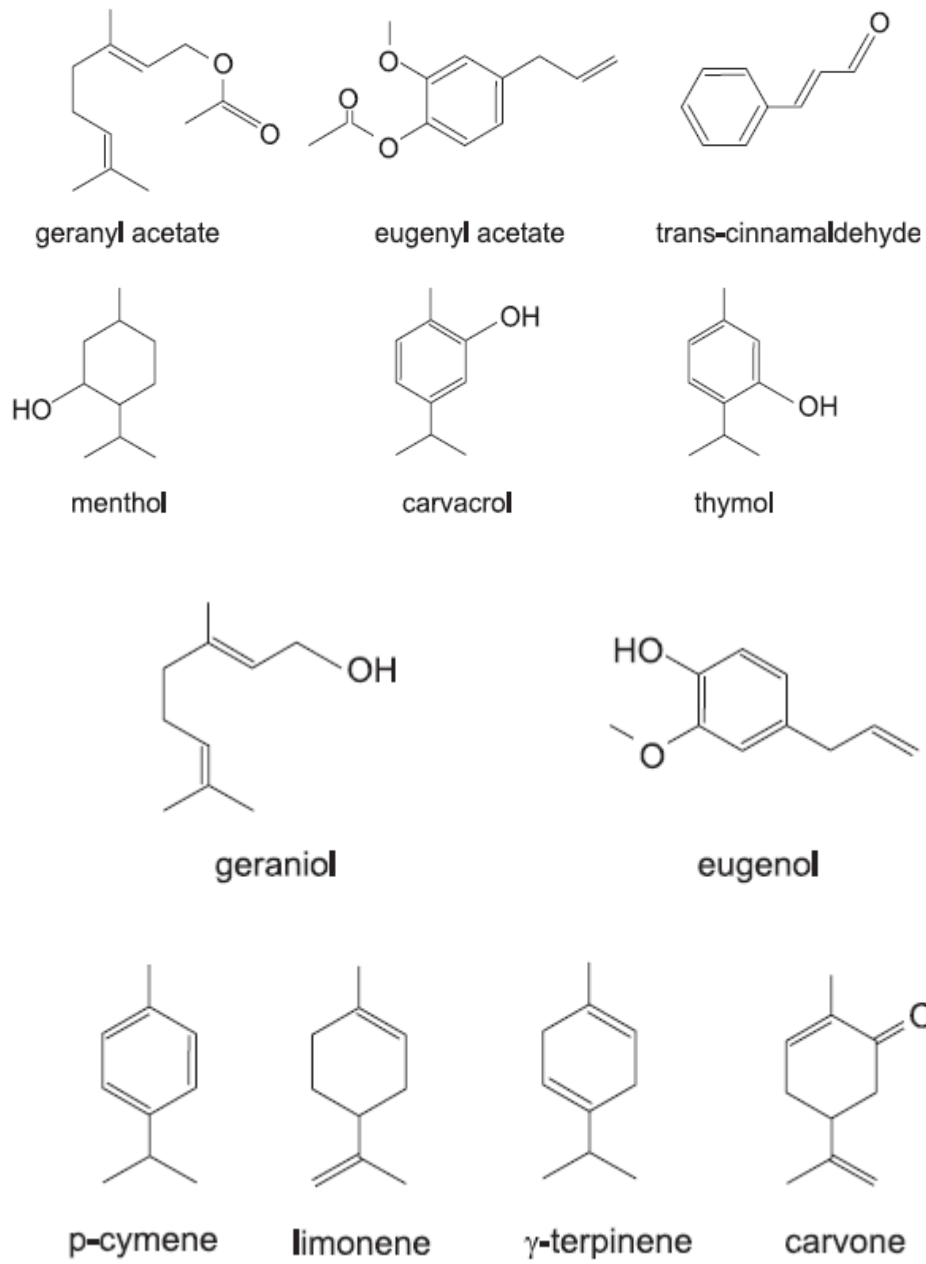
Geranyl-propionate	Camphene	1-octan-3-ol
Germacrene-d	Camphor	2,5-diethyl-tetrahydrofuran
Limonene	Carvone	3-octanol
Linallol	Carvacrol	Alpha- guaiane
Methyl-2-methyl-butate	Cis-carvacrol	Alpha – humulene
Myrcene	Cis-sabinene-hydrate	Alpha-phellandrene
P-cymene	Citronellol	Alpha – pinene
Terpinen	Citronellol-butyrate	Alpha – terpinene
Terpinen-1-ol	Dihydrocarvone	Alpha – terpineol
Terpinen-4-ol	Ethyl-cinnamate	Alpha – thujene
Terpinolene	Gamma-terpinene	Beta– caryophyllene
Thymol	Geraniol	Beta-guaiane
Trans-bergamotene	Geranyl-acetate	Beta-phellandrene
Tricyclene	Geranyl-butyrate	Beta-pinene
Trans-sabinene-hydrate	Geranyl-hexanoate	Borneol

(USDA, 2004)

تتميز بعض المركبات العطرية بامتلاكها قدرة على تثبيط نمو الأحياء الدقيقة من بكتيريا، فطور وخمائر، حيث حددت الـ USDA أهم المركبات العطرية التي تمتلك هذه الخاصية والتي تمنح الزيوت العطرية التأثير المثبط لنمو الأحياء الدقيقة ومنها: (USDA, 2004)

1. Alpha-phellandrene
2. Alpha – pinene
3. Alpha – terpineol
4. Borneol
5. Carvacrol
6. Citronellol
7. Geraniol
8. Limonene
9. Myrcene
- 10.P-cymene
- 11.Terpinen-4-ol
- 12.Thymol

وفي ما يلي صيغ أهم المركبات العطرية:



الشكل (1) يوضح صيغ أهم المركبات العطرية حسب (Burt, 2004) (Friedman *et al*,) (2002)

تمتلك الزيوت العطرية تأثيراً مثبطاً لنمو الأحياء الدقيقة، يمكن استخدامها في علاج بعض الأمراض، ويبين الجدول (2) بعض الخواص الطبية للتربينات (Gumnicuvcka & Oleszek , 1998)

الجدول(2) يوضح أهم الخواص الطبية للتربينات الشائعة.

اسم التربين	نوع التأثير الطبي
الكافور	منبه ومنشط عام بكميات قليلة وسام بكميات كبيرة
سينول	يسهل التخلص من سموم الكبد والرئة والكليتين
فيربانول	ينشط الهضم والكبد ويخفض الحرارة
لينالول	مضاد بكتيري ومضاد للحمى
جيرانيول	مضاد فيروسي وجرثومي قوي
خلات الثيوجونول	مضاد بكتيري
الثايمول	مضاد أورام
الكارفاكرول	مضاد بكتيري وفيروسي قوي منبه يدفيء الجسم

4-3- النباتات المستخدمة في الدراسة:

3-4-1- نبات الزعتر:

3-4-1-1- الوصف النباتي:

الاسم العلمي: Thymus vulgaris

الفصيلة: الشفوية Lamiaceae

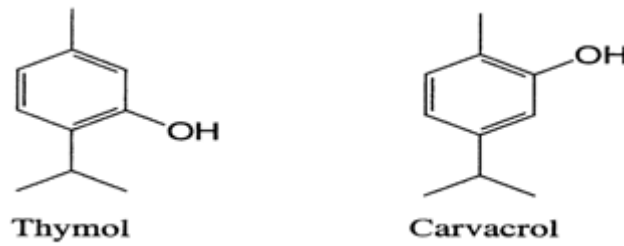
نبات عشبي غزير التفرع قائم، والسيقان خشبية الأضلاع، رمادية مغطاة بالأوبار، لونها بني، والأوراق صغيرة، بسيطة معكوسة رمحية الشكل والحافة كاملة، كثيرة العدد، ذات لون رمادي، مغطاة بالأوبار، والأزهار توجد في نورات عنقودية، إما زرقاء أو وردية، ويبلغ ارتفاع النبات حوالي 50 سم، وتحمل ثمار كبسولية صغيرة الحجم، تحتوي بذور صغيرة عديدة ومجعدة، يوجد الزيت الطيار في الغدد الزيتية، على السطح السفلي للأوراق، ويمتاز برائحته الكافورية. والجزء المستخدم من النبات هو الأوراق والقمم الزهرية، تتم زراعة الزعتر في شهر تشرين الأول أو في شهر آذار، أما الحصاد فيتم بأكثر من قطعة، الأولى في شهر أيار والثانية في شهر تشرين الأول، ويمكن أخذ ثلاث قطفات في أيار وآب وتشرين الثاني. ويبلغ الإنتاج في الهكتار الواحد حوالي 25 طن، ويزداد الإنتاج

في الأعوام التالية وتجدد زراعة المحصول عن انخفاض نسبة العشب والزيت.(راشد، 2009)

3-4-1-2- مكونات زيت الزعتر العطري:

يعتبر مركبي الكارفاكرول والثايمول المكونان الأساسيان لزيت الزعتر العطري حيث وصلت نسبتهما حوالي 14% و 34% على التوالي في زيت الزعتر العطري. (Omidbeygi *et al*, 2007)، كما بلغت نسبة الكارفاكرول حوالي 80%. (Daferera *et al*, 2003)

يمتلك الكارفاكرول والثايمول صيغ كيميائية متشابهة، حيث أنهما يمتلكان حلقة فينولية ولكن الاختلاف في موقع مجموعة الهيدروكسيل على الحلقة الفينولية. (Lambret *et al*, 2001)



الجدول(3) يوضح الصيغ الكيميائية لمركبي الكارفاكرول والثايمول (Lambret *et al*, 2001)

اسم المركب	التسمية حسب IUPAC	الصيغة الكيميائية
الكارفأكرول	5- isopropyl-2-methylphenol	C ₁₀ H ₁₄ O
الثايمول	5-mythyl-2-isopropylphenol	C ₁₀ H ₁₄ O

يعتبر الكارفاكرول المكون الأساسي لنبات الزعتر، وقد وجد في العديد من زيوت النباتات العطرية، ويستخدم كمادة منكهة وكذلك كمادة مضادة لنمو الأحياء الدقيقة. (Bertelli *et al*, 2003).

يمكن تحضير الكارفاكروول كيميائياً من الكارفون بمعاملته بالأحماض، وكذلك بتسخين الكافور بوجود اليود ويبدو بشكل زيتي عديم اللون، ويتحول إلى شكل صلب لدى تبريده، وتبلغ درجة انصهاره 0.5° م، درجة الغليان 240° م، كثافته النوعية 0.98 - 0.983. (The British Pharmaceutical codex, 2007)

تختلف نسبة وجود الكارفاكروول في بعض النباتات ومنها الزعتر، حيث تتراوح نسبة الكارفاكروول في *Thyme vulgaris* بين 9 – 60%، وفي *Thymus capitatus* بين 12.7 – 74.4%، وفي *Thymus serpyllum* بين 12 – 36.9%، وفي *T.zygis* بين 4.8 – 25%، أما *Origanum dictamnus* بين 58 – 82%. (Devincenzia et al, 2004)، وذكر في مراجع أخرى أن نسبة الكارفاكروول تراوحت بين 2 – 11% في *Thymus vulgaris*. (Juliano et al, 2000) (Cosentino et al, 1999) وبلغت نسبة الكارفاكروول في *Origanum vulgare* 0 – 80%. (Kokkini et al, 1997)، وفي *Origanum dictamnus* حوالي 51%. (Liolios et al, 2009)، وفي *Origanum compactum* حوالي 58%. (Chebli et al, 2003)، وفي دراسات أخرى

لا تقتصر فعالية مادة الكارفاكروول على تثبيط نمو الخلايا الميكروبية فقط، بل لوحظ أنه يملك تأثيراً واضحاً في تثبيط إفراز السموم من بكتيريا *Bacillus cereus*. (Ultee & Smid, 2001)

لم يسجل لمادة الكارفاكروول أي حالات سمية حادة أو مزمنة عند حيوانات التجربة أو عند الإنسان، وقد تم اعتماد مادة الكارفاكروول كمادة مضافة لغذاء الإنسان من قبل إدارة الغذاء والدواء FDA وتعتبر هذه المادة من المواد المنكهة المسموح إضافتها وفق المواصفات الأوروبية للأغذية وذلك بنسبة 25 PPM في السكاكر. (Devincenzia et al, 2004)

أما بالنسبة لمركب الثايمول في النباتات العطرية المختلفة، فهناك اختلاف كبير بينها في محتواها من الثايمول وذلك لأسباب عديدة، فقد تراوحت نسبة الثايمول في *Thymus vulgaris* بين 10 – 64% (Marino et al, 1999) (Daferera et al, 2000)، وتراوحت نسبته في الزيت العطري المتحصل عليه من *Origanum vulgare* بين 0 – 64% (Prudent et al, 1995) (Russo et al, 1998)، وبينت أبحاث أجريت لمعرفة التركيب الكيميائي للزيوت العطرية المختلفة أن نسبة الثايمول كانت 43% في *Thymus glandulosus*، و9% في

Origanum compactum (Chebli *et al*, 2003)، وكانت 0.7% فقط في نبات
Origanum dictamnus (Liolios *et al*, 2009).

تختلف نسبة وجود المكونات الأخرى لنبات الزعتر بشكل كبير بين الأبحاث التي تطرقت
 لتحديد المكونات الكيميائية لزيت الزعتر العطري، حيث أن هناك عدة عوامل تساهم في تغيير
 هذه المكونات بشكل كبير، ففي دراسة أجريت لتحديد مكونات الزيت العطري لنبات الزعتر
 كانت المكونات الرئيسية كما هو مذكور في الجدول (4)، وذكر الباحث بعض المكونات الأخرى
 المتواجدة في الزيت بنسب قليلة ومنها β -pinene، α -terpinene، α -limonene،
 geraniol، terpineol و bornyl acetate (Grigore *et al*, 2010).

الجدول (4) يوضح المكونات الأساسية لزيت الزعتر العطري حسب الباحث Grigore عام
 2010

نسبته %	اسم المركب
Monoterpene hydrocarbons	
1.23	α -pinene
30.5	p-cymene
4.24	Sabinene
1.63	Myrcene
Monoterpene eters	
1.24	1,8-cineole
Monoterpene alcohols	
2.73	Linalool
3.16	Borneol
Terpenoidic phenols	
31	Thymol
3.5	Carvacrol

حددت نسب المكونات الكيميائية لنبات الزعتر في بحث آخر، حيث تم جمع العينات من
 مناطق مختلفة لمعرفة مدى التغير في نسب مكونات معينة والجدول (5) يبين مدى التباين في
 نسبة المكونات الكيميائية للزعتر البري. (Raal & Orav, 2005)

الجدول(5) يوضح مدى اختلاف نسب مكونات زيت الزعتر المستخلص من نباتات جمعت من مناطق مختلفة. (Raal & Orav, 2005)

نسبته %	اسم المركب
75.7-0.9	Thymol
83.5 – 1.5	Carvacrol
34.4 – 4.3	p-cymene
19.7 – 0.9	γ -terpinene
4.8 – 0.4	Linalool
9.3 – 0.5	β -caryophyllene
3.8 – 0	Terpinen-4-ol

تختلف نسبة الثايمول والكارفاكرول وكذلك مكونات الأخرى في الزيت العطري لنبات الزعتر البري حيث تراوحت نسبة الثايمول بين 0.9 – 75.7% ونسبة الكارفاكرول بين 1.5 – 83.5%. (Raal & Orav, 2005) وكذلك تختلف كمية الزيت العطري المستخلص باختلاف التوزيع الجغرافي للنبات ونوعية التربة والطور النباتي حيث تراوحت في دراسة أجريت على الزعتر البري من 2.7-5.5%. (Abu-darwish & Abu-Dieyeh, 2009)

3-1-4-3- التأثير المثبط للكائنات الحية الدقيقة لزيت الزعتر:

يعتبر كل من الثايمول والكارفاكرول من المركبات الأساسية في نبات الزعتر البري، وقد تبين أن لمركب الثايمول دور في تثبيط عدد كبير من الأنواع البكتيرية والفطرية المدروسة حتى الآن. (Pattnait, 1997)

يمتلك الثايمول تأثيراً مثبطاً لنمو كل من بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhomurium*، ولوحظ أن هناك تأثير لدرجة الـ pH، حيث أن pH 5.5-6.5 هو الـ المثالي لعمل مركب الثايمول كمضاد ميكروبي. (Juven et al, 1994)، وقد لوحظ تأثير مثبط لنمو خميرة *Yarrowia lipolitica*. (Karanika et al, 2001)

يعد كل من الثايمول والكارفاكرول مضادات ميكروبية جيدة وهما من المكونات الأساسية لنبات الزعتر، حيث أنهما يحدان من نمو *Escherichia coli* ومن نمو بعض الأنواع الجرثومية التابعة لجنس *Salmonella*، حيث تبين لدى مقارنة كل منهما مع المضادات البكتيرية الأخرى تفوق كل من الثايمول والكارفاكرول على باقي المضادات الجرثومية، حيث أن كمية 1.2 ميلي مول من الثايمول كافية للقضاء على بكتيريا *Escherichia coli*، بينما

ارتفعت الكمية اللازمة للقضاء على هذه البكتيريا إلى 1.5 ميلي مول عند استخدام الكارفاكروول، ولوحظ كمية 1 ميلي مول من أحد هذين المركبين كافية للقضاء على بكتيريا *Salmonella typhimorium*، والجدول (6) يوضح الكميات المستخدمة من كل من المضادات الميكروبية التي تعتبر نباتية المصدر ومقارنتها مع كل من الكارفاكروول والثايمول، علماً بأن التركيز من المادة الفعالة بالجدول معطى بالملي مول في اللتر. (Olasupo et al, 2003)

الجدول(6) يوضح تأثير بعض المكونات النباتية في *Salmonella typhimorium* و *Escherichia coli*

المادة المختبرة	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimorium</i>
نايزين	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير
كارفاكروول	1.5	1
سيناميك أسيد	5	7.5
داي أسيتيل	7.5	12.5
إيوجينول	2.5	3
ثايمول	1.2	1

(Olasupo et al, 2003)

يملك الكارفاكروول تأثيراً مثبطاً لنمو بكتيريا *Listeria monocytogenes* (Pol & Smid, 1999)، وعند مقارنة تأثير الكارفاكروول مع عدد من المواد المطهرة والصادات الحيوية ظهرت النتائج كما في الجدول (7) حيث أبدى الكارفاكروول تأثيراً كبيراً على كل من بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhi* و *Bacillus subtilis* بالإضافة إلى خميرة *Candida albicans* فبلغ قطر بقعة الصد 34 مم عند تطبيق الكارفاكروول على بكتيريا *Escherichia coli* وبذلك يكون الكارفاكروول هو المركب الأقوى من بين المضادات الميكروبية والمواد المطهرة الأخرى من حيث تثبيطه لهذا النوع الميكروبي كما بلغ قطر بقعة الصد 38 مم لدى تطبيق الكارفاكروول على خميرة *Candida albicans* وهو أعلى قطر صد إذا ما قورن مع باقي المضادات الميكروبية. (Kunle et al, 2003)

الجدول(7)يوضح أقطار التثبيط لبعض المواد المطهرة والكارفاكروول.

قطر التثبيط للميكروب مقدراً بالملم						المضاد الميكروبي المستخدم
Candida albicans	Bacillus subtilis	Salmonella typhi	Pseudomonas aeruginosa	Esherichia coli	Staphylococcus aureus	
24	11	9	-	9	9	هكسان
12	11	-	-	-	-	داي كلورو ميتان
38	26	24	-	34	27	كارفاكروول
-	-	-	-	-	-	ميتانول
-	10	لم يختبر	22	20	12	أمبيسيلين
16	-	-	-	-	-	ثيوكونازول

(Kunle et al, 2003)

أثبت أيضاً أن للكارفاكروول تأثيراً مثبطاً لنمو بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* حيث أنه بلغ قطر دائرة التثبيط حوالي 23مم (Dorman & Deans, 2000)

إضافة الكارفاكروول والفيتامين B1 إلى عصير التفاح غير المبستر وذلك بتركيز منخفض جداً (0.25-1.25)% وحفظها لمدة 3-19 يوم خفض من نمو بكتيريا *Escherichia coli* وأطال من مدة حفظ العصير سواء عند حفظه بدرجة حرارة 4 °م أو بدرجة حرارة الغرفة 25 °م. (kisko & Roller, 2005)

لوحظ أن ألبومين السيروم البقري قد خفض من النشاط المضاد لمركب الثايمول، حيث افترض تكوين معقدات بينه بشكل خاص والمركبات الفينولية بشكل عام وبين البروتينات في الغذاء. (Juven et al, 1994) وهذا الارتباط يمنع ارتباط المواد الفينولية الفعالة بالبروتينات الموجودة في غلاف الخلية التي تعتبر الهدف الأساسي للزيوت العطرية. (Ultee et al, 1998)

أشارت أبحاث متعددة إلى التأثير المثبط الواضح لنمو الأحياء الدقيقة لزيت الزعتر العطري، ففي دراسة أجريت تبين أن لزيت الزعتر العطري تأثير مثبط على مجموعة من الأحياء الدقيقة ضمت *E.coli* O157H7، *Staphylococcus aureus*، *Yersinia enterocolitica* و *Salmonella typhi*، حيث وجد أن الزعتر ثبت نموها بشكل واضح، وكانت بكتيريا *Staplylococcus aureus* أكثرها حساسية. (Sagdic, 2003)

أجريت دراسة مماثلة على تأثير نبات الزعتر الأسود في مجموعة من البكتيريا ضمت:

Aeromonas hydrophila, Salmonella typhi, Bacillus amyloliquefaciens, B.brevis, B.cereus, B.subtilis, E.coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Proteus vulgaris, Corynebacterium xerosis, Enterococcus faecalis.

تبين أن زيت الزعتر الأسود العطري يملك فعالية مضادة لنمو الأحياء الدقيقة السابقة بتركيز أقل من 1% (v/v) ويعتقد أن معظم التأثير المثبط عائد للكافركول الموجود بنسبة 75.5% في الزيت العطري السابق. (Valero & Salmeron, 2003).

يملك زيت الزعتر العطري تأثيراً مثبطاً لنمو بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* وغيرها من البكتيريا الممرضة، حيث تم اختبار تأثيره المثبط بدون تخفيف للزيت العطري فكان قطر دائرة التثبيط حوالي 28 مم. (Dorman & Deans, 2000)

أجريت دراسة لتقدير النشاط المضاد للأحياء الدقيقة الممرضة الموجودة في الحليب الخام، لكل من الزيوت التالية: الزعتر، الميرمية والغار على الأحياء الدقيقة التالية: *E.coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus & Candida albicans*، تمت الدراسة في بيئة الحليب المعقم وبيئة صناعية من الأغار حيث يوجد تناسب طردي بين القدرة على التثبيط وتركيز الزيت العطري في كل من البيئة الطبيعية والصناعية، وقد كانت بكتيريا *E.coli* و *Staphylococcus aureus* أكثر حساسية من بكتيريا *Listeria monocytogenes* حيث أن زيت الزعتر العطري منع نمو جميع البكتيريا المدروسة بتركيز 0.5%. (Celikel & Kavas, 2008)

قارنت بعض الأبحاث بين التأثير المضاد للزيوت العطرية في نمو الأحياء الدقيقة في البيئات الصناعية والبيئات الطبيعية حيث لوحظ انخفاض واضح في تأثير هذه الزيوت العطرية في نمو الأحياء الدقيقة في البيئات الطبيعية مقارنة مع الصناعية حيث أنه في دراسة قارنت بين تأثير زيت الزعتر على فطر *Aspergillus flavus* في بيئة مرق الدكستروز الصناعية وبيئة طبيعية من رب البندورة حيث لوحظ أن التثبيط الكامل (100%) لزيت الزعتر كان بتركيز PPM350 أما تأثير زيت الزعتر على الفطر نفسه في بيئة رب البندورة فقد انخفض إلى (87%) عند استخدام PPM500 وافترض أن السبب هو أن التركيب المعقد للوسط الغذائي يشكل حماية للأحياء الدقيقة ضد المضادات الميكروبية. (Omidbeygi et al, 2007)

تبين في دراسة أجريت أن لزيت الزعتر البري تأثير مثبط لنمو فطري *Botrytis cinerea* و *Fusarium sp* بنسبة 100% (Chebli et al, 2003)، وكذلك وجد أن له تأثير مثبط لنمو فطر *Penicillium digitatum* حيث لوحظ هذا التأثير بتركيز منخفضة نسبياً بلغت حوالي 1-1.5% (Daferera et al, 2000)

أما بالنسبة لتأثير زيت الزعتر العطري في نمو الخمائر المسببة للفساد الغذائي، فقد تم دراسة تأثيره المثبط مع زيوت عطرية أخرى، في نمو بعض أنواع الخمائر وهي:

Candida albicans, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*,
Saccharomyces cerevisiae, *Yarrowia lypolitica*

يملك زيت الزعتر العطري تأثيراً مثبطاً لنمو جميع الخمائر المدروسة وبتركيز منخفضة نسبياً مقارنة بالزيوت الأخرى، فقد تراوح أقل تركيز مثبط لنمو هذه الخمائر بين 0.3 – 0.6%. (Sacchettie et al, 2005)، وقد لوحظ نفس التأثير المثبط لزيت الزعتر العطري في نمو خميرة *Candida albicans* الموجودة في بيئة الحليب حيث كان تركيز 1% كان كافياً لتثبيط نمو الخميرة المدروسة بنسبة 100%. (Celikel & Kavas, 2008)

3-4-2- نبات إكليل الجبل:

3-4-2-1 الوصف النباتي:

الاسم العلمي: Rosmarinus officinalis

الفصيلة: الشفوية Lamiaceae

يعد نبات إكليل الجبل من النباتات الطبية الواسعة الانتشار في العديد من دول العالم. يزرع إكليل الجبل في مناطق عدة من العالم، وتتركز زراعته في منطقة البحر المتوسط، وله أسماء عدة منها: حصى البان، إكليل النفساء، الروزماري وندى البحر. إكليل الجبل هو نبات شجيري معمر يتراوح طوله من 50-200 سم، تبعاً للخدمات الزراعية ومنطقة الزراعة، علماً بأن النبات يتحمل التباين الشديد في درجات الحرارة، ويتكاثر النبات جنسياً بالبذور التي تزرع في فصل الخريف أو خضرياً بتجذير العقل الطرفية في الربيع أو الخريف، ويمكن زراعته في مختلف أنواع الترب ويبدأ نموه بشكل سريع بعد عام من زراعته. (الصالح، 1998)

3-4-2-2 مكونات زيت إكليل الجبل العطري:

تعددت مكونات زيت إكليل الجبل العطري، وكذلك اختلفت نسب هذه المكونات في الزيت العطري المستخلص، واختلفت نسب الزيت المتحصل عليه، وذلك لعوامل عدة.

اختلفت الأبحاث التي حددت مكونات زيت إكليل الجبل العطري من حيث المادة الكيميائية ذات النسبة العظمى في الزيت العطري، لكن معظم الأبحاث بينت أن مادة الـ α -pinene كانت تشكل النسبة الأعلى في زيت إكليل الجبل العطري، حيث بلغت أكثر من 21% (Heravi et al, 2011)، وشكلت مادة الـ Camphene نسبة عالية من مكونات زيت إكليل الجبل العطري حيث بلغت أكثر من 10% أحياناً (Jiang et al, 2011)، وتوجد مادة الـ 1,8-Cineole بنسبة عالية في الزيت العطري كما أشارت بعض الأبحاث حيث بلغت حوالي 23% (Heravi et al, 2011)، وبلغت نسبة مادة الـ Eucalyptol أكثر من 30% في بحث مشابه (Daferera et al, 2003).

وضح الباحث Jiang وزملاؤه في بحث أجري على زيت إكليل الجبل العطري لتحديد مكوناته ونسبها وقد كانت النتائج كما هو في الجدول رقم (8)

الجدول(8) يوضح مكونات زيت إكليل الجبل العطري ونسبتها حسب الباحث Jiang عام 2011

النسبة المئوية	اسم المركب
26.5	1,8-Cineole
20.14	α -Pinene
12.9	Camphor
11.38	Camphene
6.95	β -Pinene
3.1	Borneol
2.37	β -Caryophyllene
1.95	α -Terpineol
1.59	p-Cymene
1.36	Verbenone
1.32	Limonene
1.02	γ -Terpinene

يوضح الجدول أن مركبات α -Pinene و Camphene و 1,8-Cineole و Camphor شكلت النسبة العظمى من مكونات زيت إكليل الجبل العطري. (Jiang et al, 2011)

قام الباحث Heravi وزملاؤه بإجراء دراسة لتحديد مكونات زيت إكليل الجبل العطري، واستطاع تحديد 65 مكوناً في زيت إكليل الجبل العطري، والجدول (9) يبين أهم هذه المكونات.

الجدول(9) يوضح أهم مكونات زيت إكليل الجبل العطري ونسبتها حسب Heravi عام 2011

النسبة المئوية	اسم المركب
21.7	α -Pinene
23.5	1,8-Cineole
7.2	Camphor
7.6	Berbonone
4.5	Eucalyptol
3.5	Borneol
1.78	α -Terpineol
1.42	β -Myrcene
1.52	L-Linalool
1.1	4-Terpineol
0.9	1,4-Terpineol

هناك مكونات لم تتجاوز نسبتها 1% ومنها: 1-Pinene، Camphene، Tricyclene، Sabinene، 3-Octanen، p-Cymene، α -Terpinene، α -Thunjene، γ -Terpinene، α -Terpinolene، Chrysanthenone، 3-Pinanone، Myrtenol، Neryl، Methyl eugenol، Sabinol، Thymol، Homo myrtenol، acetate (Heravi et al, 2011).

أجرى الباحث Daferera وزملاؤه دراسة حدد فيها مكونات زيت إكليل الجبل العطري باستخدام تقنية الـ GC، فكانت المركبات العطرية الـ Eucalyptol بنسبة 31.5% و Boreanol بنسبة 14.2% و α -Pinene بنسبة 12.7%، هي المركبات العطرية ذات النسبة الأعلى في زيت إكليل الجبل العطري، وكانت نسبة الكارفكرول في الزيت لعطري حوالي 6%، وبلغت نسبة كل من Camphene، Camphor، α -Terpineol، Verbenone، أكثر من 4%، وكانت نسبة كل من β -Pinene، β -Myrcene، Linalool، Thymol حوالي 1% فقط. (Daferara et al, 2003)

3-2-4-3- التأثير المثبط لنمو الأحياء الدقيقة لزيت إكليل الجبل:

ينسب التأثير المثبط لأي زيت عطري بتأثير المكونات التي تكون النسبة العظمى منه ، يعتبر مركب الـ α -Pinene من المكونات الأساسية في زيت إكليل الجبل العطري، فيعتقد أن التأثير المثبط للزيت العطري يعود بمعظمه لهذا المركب في حال وجوده بتركيز عالي، وهذا ما تم إثباته في بحث أجراه Jiang وزملاؤه لدراسة التأثير المثبط لكل من زيت إكليل الجبل العطري ومركبي الـ α -Pinene و 1,8-Cineole، حيث أن الأخيرين بلغت نسبتهما حوالي 20% و 26.5% على التوالي في الزيت العطري، وتمت الدراسة على البكتيريا التالية *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*، فوجد أن الزيت العطري قادر على تثبيط نمو البكتيريا المدروسة بتركيز منخفضة نسبياً تراوحت بين 0.2-0.5%، كما أن مركبي α -Pinene و 1,8-Cineole يمتلكان تأثيراً مثبطاً لنمو البكتيريا السابقة، حيث تراوح أقل تركيز مثبط لنمو هذه البكتيريا بين 0.3-2% و 0.3-4% على التوالي، والجدول (10) يبين ما سبق. (Jiang et al, 2011)

الجدول(10)يوضح أقل تركيز مثبط من زيت إكليل الجبل و α -Pinene و Cineole-1,8 لنمو البكتيريا.

أقل تركيز مثبط لنمو البكتيريا المذكورة (%v/v)			البكتيريا
1,8-Cineole	α -Pinene	Rosemary oil	
4	2	0.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
0.3	0.3	0.2	<i>Staphylococcus aureus</i>
4	2	0.3	<i>Escherichia coli</i>
4	2	0.3	<i>Salmonella typhi</i>

يلاحظ أن هناك اختلاف واضح في قدرة كل من الزيت العطري ومكوناته الرئيسية على تثبيط نمو البكتيريا، حيث أن الزيت العطري يمتلك تأثيراً مثبطاً أعلى من مكوناته (α -Pinene و 1,8-Cineole)، ويعتقد أن هذا التباين يعود إلى قدرة المضاد الميكروبي المختبر على اختراق جدار الخلية. (Cox et al., 2000)

يعتبر زيت إكليل الجبل العطري من الزيوت العطرية التي تمتلك قدرة عالية على تثبيط نمو البكتيريا الممرضة، ففي بحث أجري لدراسة التأثير المثبط لزيت إكليل الجبل في نمو بكتيريا *Staphylococcus aureus*، *Salmenellatyphi*، *E.coli*، *Pseudomonasaeruginosa*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes* وتبين أنه قادر على تثبيط نمو البكتيريا المذكورة بتركيز منخفض نسبياً بلغت حوالي 0.5% (Krajčová et al, 2008)

يمتلك زيت إكليل الجبل العطري تأثيراً مثبطاً لنمو بكتيريا *Klebsiella pneumoniae*، حيث تم اختبار تأثيره المثبط بدون تخفيف للزيت العطري فكانت قطر دائرة التثبيط حوالي 21 مم. (Dorman & Deans, 2000)

تمتلك مكونات الزيوت العطرية تأثيراً مثبطاً لطيف واسع من البكتيريا الممرضة وغير الممرضة، حيث تم التوصل لهذه النتيجة من خلال اختبار التأثير المثبط لمختلف مكونات الزيوت العطرية في نمو 25 نوع بكتيري كما بين الجدول (11). (Dorman & Deans, 2000)

الجدول(11)يوضح التأثير المثبط لبعض مكونات زيت إكليل الجبل العطري في نمو بعض البكتيريا الممرضة.

قطر دائرة التنشيط (مم)					البكتيريا
limonene	linalool	eugenol	Borneol	α -penine	
11.2	14	13.5	7	9	<i>Escherichia coli</i>
7	13	11	لا تأثير	8.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
لا تأثير	لا تأثير	15.5	لا تأثير	لا تأثير	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
لا تأثير	7.5	13	لا تأثير	8	<i>Salmonella typhi</i>
لا تأثير	9	11.5	7	8.5	<i>Staphylococcus aureus</i>

(Dorman &Deans, 2000)

يوضح الجدول (11) أن مكونات الزيوت العطرية تتباين كثيراً فيما بينها من حيث التأثير المثبط لنمو البكتيريا، وذلك يعتمد على نوع المادة الفعالة المثبطة ونوع البكتيريا، وذلك يؤكد أن التأثير المثبط لأي زيت عطري يعود لتأثير مكون معين ذو التأثير المثبط الأكثر فعالية، وفي حالة إكليل الجبل فقد بينت الأبحاث أن كل من الـ α -penine و eugenol هما المكونين الأكثر قدرة على التنشيط فيه. (Dorman &Deans, 2000) (Pelczar et al, 1988)

وجد في بحث أجري لدراسة التأثير المثبط للمستخلص الإيتانولي لنبات إكليل الجبل العطري لنمو بعض البكتيريا الممرضة، أن هناك عوامل يمكن أن تزيد من التأثير المثبط للمستخلص، فقد لوحظ أن كل من ملح الطعام، الـ pH المنخفض ودرجة الحرارة المنخفضة قد ساهمت في تخفيض التركيز المثبط لنمو البكتيريا (Campo et al, 2000)، وكذلك وجد أن لكل من فيتامين C وأشعة الـ UV تأثير مثبط مساعد لتأثير زيت إكليل الجبل العطري المثبط لنمو الأحياء الدقيقة. (Djenane et al, 2003)

أجريت أبحاث عديدة لدراسة التأثير المثبط لزيت إكليل الجبل العطري في نمو بعض أنواع الفطور، وتعتبر هذه الخاصية هامة جداً من الناحية الصحية والاقتصادية، حيث أنها تستخدم كبدائل عن المركبات الكيميائية التي تعالج بها الفواكه والخضروات في فترة التخزين بعد الحصاد، لمنع نمو الفطور على سطحها، ومن جانب آخر، استخدام الزيوت العطرية يحد من استخدام المواد الكيميائية المضادة لنمو الفطور (Brent & Hollomon, 1998)، حيث تبين في

بحث أجراه Daferera وزملاؤه، لدراسة تأثير زيت إكليل الجبل المثبط لنمو الفطور التالية *Botrytis cinerea* و *Fusarium sp*، فوجد أن له تأثير مثبط لنموهما، حيث أنه منع تكوين الميسيليوم لكلا الفطرين بتركيز عالي نسبياً بلغ حوالي 1000 مغ/مل، وخفض هذا التركيز من الزيت النمو الفطري بمقدار 72%. وافترض الباحث أن هذا التأثير المثبط لنمو الفطور المذكورة يعود لمركب الـ Borneol، واستنتجت هذه الملاحظة من خلال مقارنة تأثير زيت إكليل الجبل الحاوي على مادة الـ Borneol بنسبة 14.2% مع زيوت نباتات عطرية أخرى لا تحوي هذه المادة. (Daferera et al, 2003)

اختبر Daferera وزملاؤه التأثير المثبط زيت إكليل الجبل العطري في نمو فطر *Penicillium digitatum*، فوجد أنه لا يملك تأثير مثبط لهذا الفطر. (Daferera et al, 2000)

يمتلك زيت إكليل الجبل العطري تأثيراً مثبطاً لنمو الخمائر، كما بينت الكثير من الأبحاث التي اختبرت هذا التأثير في نمو مختلف أنواع الخمائر، حيث وجد الباحث Sacchettie وزملاؤه في دراسة أجريت لتحديد أقل تركيز مثبط من زيت إكليل الجبل العطري لنمو الخمائر التالية *Candida albicans*، *Rhodotorula glutinis*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Yarrowia lypolitica*، *Schizosaccharomyces pombe*، حيث بينت النتائج أن أقل تركيز مثبط لنمو الخمائر المذكورة تراوح بين 0.06 – 0.18 مغ/مل كما هو مبين في الجدول (12). (Sacchettie et al, 2005).

الجدول (12) يوضح أقل تركيز مثبط من زيت إكليل الجبل العطري لنمو بعض أنواع الخمائر.

أقل تركيز مثبط مغ/مل	الخميرة
0.09	<i>Candida albicans</i>
0.12	<i>Rhodotorula glutinis</i>
0.06	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0.12	<i>Yarrowia lypolitica</i>
0.18	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

(Sacchettie et al, 2005)

اختبر التأثير المثبط لكل من زيت إكليل الجبل العطري ومكوناته الرئيسية (α -Pinene و 1,8-Cineole) في نمو خميرة *Candida albicans* حيث لوحظ تأثيراً قوياً لكل منها، فكان أقل

تركيز مثبط لنمو الخميرة منخفض نسبياً حيث بلغ 0.1%، 0.5%، 0.5% (v/v) على التوالي، وقد لوحظ زيادة في قطر التثبيط مع زيادة التركيز المستخدم (Jiang et al, 2011)

3-5- تلوث الغذاء بواسطة الأحياء الدقيقة والمخاطر الناجمة عنها:

تعتبر الكائنات الحية الدقيقة المسبب الأساسي لفساد الأغذية وانتقال الأمراض عبر الغذاء إلى الإنسان وخاصة التسممات الغذائية وبشكل عام يمكن وضع الكائنات الدقيقة الملوثة للغذاء في ثلاث مجموعات رئيسية هي: البكتيريا، الفطور والخمائر. وقد يحدث التلوث بكائنات أكبر نسبياً في الحجم تتبع وحيدات الخلية (البروتوزوا) والأميبا وكلاهما يسبب أمراضاً عديدة. (Mathews et al, 1990) (Andersson et al, 1995)

تسبب أنواع عديدة من البكتيريا والفطور والخمائر فساد الأغذية وتشترك جميعها في خاصية هامة هي القدرة على إفراز أنزيمات معينة تعمل على تحليل مكونات الغذاء، وبعضها يفرز أنزيمات محللة للبروتين والبعض الآخر يفرز أنزيمات محللة للدهون أو السكريات، وبعض السلالات قد تفرز أكثر من نوع من الأنزيمات المحللة، وعموماً فإن التحلل الأنزيمي بواسطة الأحياء الدقيقة يسبب تغيرات واضحة في تركيب المادة الغذائية وصفاتها الحسية. (Sara & Latta, 1999) وتجدر الإشارة إلى أن بعض الأنواع الميكروبية تسبب للفساد والتسمم الغذائي في الوقت نفسه. (Corlet & Staier, 1990)

3-5-1- بعض أنواع البكتيريا المسببة للتسمم الغذائي:

تحدث حالات التسمم الغذائي نتيجة استهلاك الإنسان لغذاء ملوث بسلالات من جراثيم نوعية منتجة للسموم Endotoxins، وهي ذيفانات داخلية أي تدخل في بنية الميكروب وتخرج عند تحلله، أو قد تنتج التسمم الغذائي عن بعض السلالات المفرزة للسموم خارجية Exotoxins، حيث تقوم الأحياء الدقيقة الحية بإفراز السموم بشكلها المنحل في الغذاء، وتفرز للوسط قبل موت الأحياء الدقيقة. (Corlet & Staier, 1990)

3-5-1-1- *Salmonella typhi*:

هي جراثيم عصوية متحركة، غير متبوعة، سالبة الغرام، واسعة الانتشار عند الحيوانات وخاصة الدواجن. أما مصادرها البيئية فتشمل الماء، التربة، الحشرات، براز الحيوان، اللحوم النيئة، والأطعمة البحرية النيئة. يؤدي التسمم الحاد بهذه الجراثيم إلى الإصابة بالحمى التيفية عند الإنسان، ويتجلى هذا المرض بالأعراض التالية: إقياء، مغص، إسهال، ارتفاع بالحرارة

وصداع، وقد تظهر أعراض التهابات المفاصل بعد الأعراض الحادة بفترة تتراوح بين 3-4 أسابيع، تمتد فترة الحضانة: من 6 إلى 48 ساعة، أما الجرعة المعدية: فقد تصل إلى 15-20 خلية، حسب عمر المريض وحالته الصحية، تستمر الأعراض الحادة يوماً أو يومين، أو قد تطول أكثر من ذلك حسب حالة المريض الفيزيولوجية والجرعة المتناولة ونوع السلالة الجرثومية، أما الآلية الإمراضية لهذه الميكروبات، فتتمثل باختراقها لجدار الأمعاء وغزوها للخلايا المبطنة، حيث يحدث الالتهاب، وهناك دليل على إنتاج سم معوي داخل الخلية المعوية. يتم التعرف على هذه البكتيريا بواسطة اختبارات مصلية عن طريق الزرع الجرثومي لبراز المريض، تنتقل العدوى بجراثيم *Salmonella* عن طريق البيض، الأسماك، اللحوم وخاصة لحوم الدواجن، الألبان ومشتقات الحليب الملوثة وخاصة منها المضاف إليها البيض وكذلك عن طريق الخضار إذا ما رويت بمياه ملوثة. (Olasupo et al, 2003)

:Echerichia coli-2-1-5-3

هي جراثيم عصوية قصيرة، سالبة الغرام، توجد بشكل كبير في الطبيعة، ووجودها بالماء دليل على تلوثها بمياه الصرف الصحي، تسبب جراثيم *Escherichia coli* التهاباً معدياً معوياً وتشمل أعراض العدوى بها، إسهال مائي، مغص، حمى خفيفة وغثيان. وأجريت دراسات على متطوعين تبين أن الإصابة بالمرض تتطلب وصول كمية كبيرة جداً من الخلايا الجرثومية للـ *Escherichia coli* إلى الأمعاء الدقيقة للإنسان حيث تتكاثر وتنتج السموم التي تؤدي إلى إفراز السوائل وخاصة السلالة *H70157*. إذا كانت العدوى شديدة، يتم إفراز أعداد كبيرة من الجراثيم المسممة للأمعاء في البراز ويبدأ بالإسهال بعد 24 ساعة. بينما تكفي كمية قليلة من الجراثيم لإصابة الرضع بهذا المرض. يمكن التمييز بين السلالات الممرضة وغير الممرضة لجراثيم *Escherichia coli* في الأمعاء بعد اختبارات مناعية كيميائية، واختبارات مزارع الأنسجة أو اختبارات وراثية مصممة لكشف السم أو الجين الذي ينتجه، وبهذه الاختبارات يمكن إتمام التشخيص في نحو 3 أيام، ولا تشكل جراثيم *Escherichia coli* خطراً في البلدان التي تتبع معايير وممارسات صحية جيدة وقد يؤدي تلوث مياه الشرب بمياه الصرف الصحي إلى تلوث الأغذية بهذه الجراثيم. (Beers& Berkow, 2002) (Olasupo et al, 2003)

:Klebsiella pneumoniae-3-1-5-3

هي بكتيريا عصوية موجبة الغرام، غير متحركة، لها كبسولة مخاطية من عديدات السكر، تخمر اللاكتوز، هوائية اختياريًا بعض سلالاتها تنتج سم معقد خارج الخلايا. توجد في

الفلورا الطبيعية للفم، البلعوم، الجلد و المعى. توجد عادة في التربة و30% من سلالاتها تستطيع تثبيت النتروجين بالظروف الهوائية. تشكل هذه البكتيريا مستعمرات كبيرة رطبة نسبة لوجود الكبسولة المخاطية. (Postgate, 1998) (Straus, 1987)

تميل هذه البكتيريا لإصابة الأشخاص ضعيفي المناعة، ومن أكثر الأمراض الشائعة التي تسببها، ذات الرئة حيث تحدث تموت لخلايا الرئة ونزف والتهاب يولد مادة هلامية مخاطية دموية كثيفة بالإضافة للتهاب الفقرات والأوعية الدموية والمرارة والتهاب العظام والتهاب السحايا، ومعظم الإصابات تحدث للمرضى في المستشفيات، حيث يعتبر البراز وأدوات المرضى احد عوامل نقل الإصابة، ويعتبر متوسطي وكبار السن من الفئات المستهدفة وخاصة المصابين بالسكري ومدمني الكحول. تصنف هذه البكتيريا في المرتبة الثانية بعد بكتيريا *Escherichia coli* بإصابات الجهاز البولي لكبار السن، كما تعتبر عامل ممرض انتهازى للمصابين بالأمراض المزمنة للرئة وضمور الغشاء المخاطي الأنفي. تتركز الأماكن الإصابة في الجهاز البولي ، الطرق الصفراوية، جهاز التنفس ومناطق الجراحة. يقل معدل الوفيات التي تسببها إلى أكثر من 50% بعد المعالجة بالمضادات الحيوية. (Rashid & Ebringer, 2006) (Straus, 1987)

:Staphylococcus aureus-4-1-5-3

هي جراثيم كروية الشكل تظهر تحت المجهر بشكل أزواج، أو سلاسل قصيرة أو بشكل مجموعات عنقودية، موجبة الغرام، تقوم بعض سلالاتها بإنتاج ذيفان بروتيني متحمل للحرارة ويسبب مرض الإنسان، تسبب هذه الجراثيم التسمم الغذائي الستافيلوكوكي هو اسم الحالة الناتجة عن السموم المعوية التي تنتجها بعض سلالات *Staphylococcus aureus* وعادة ما تتطور أعراض هذا التسمم الغذائي بشكل سريع وحاد، حسب حساسية المريض للذيفان في هذا الغذاء، والحالة الصحية العامة له، وتتجلى أعراض التسمم الستافيلوكوكي بغثيان وإقياء ومغص إرهاب عام، وقد لا تبدو كافة الأعراض عند بعض الأشخاص. يحدث صداع وتقلصات عضلية وتغيرات عارضة في ضغط الدم ومعدل النبض في الحالات الشديدة. يحتاج الشفاء عموما إلى يومين، إلا أنه في كثير من الحالات يتأخر الشفاء إلى 3 أيام، أو أكثر في الحالات الشديدة، تعتبر الأغذية البروتينية مثل اللحم ومنتجاته والدواجن ومنتجات البيض من أكثر الأغذية التي تسبب التسمم الستافيلوكوكي والأغذية المرتفعة الحموضة عند انخفاض حموضتها، والحليب ومنتجات الألبان. ويعتبر أي نوع من الطعام يتطلب الكثير من الملامسة باليد أثناء إعدادة، ثم

يحفظ في درجات حرارة مرتفعة نسبيا بعد الإعداد حتى لو لساعات قليلة من الأطعمة التي تشجع على تكاثر *Staphylococcus aureus*، كما توجد جراثيم *Staphylococcus aureus* في الهواء والغبار وعوادم الصرف الصحي والماء أو على معدات تصنيع الأغذية، كما أن جراثيم *Staphylococcus aureus* موجودة في شعر وجلد 50% من الأصحاء، وتزيد هذه النسبة بين من يخالطون أو يلامسون المرضى في المستشفيات. والسبب الرئيسي لحدوث التسمم stafylococcal هو ابتلاع الذيفان المعوي لبعض سلالات جراثيم *Staphylococcus aureus* المفرز في الطعام بسبب عدم كفاية تعقيم الغذاء بدرجة حرارة كافية (60 °م أو أكثر). من النادر جدا حدوث الوفاة نتيجة حدوث التسمم stafylococcal، رغم تسجيل بعض الحالات عند كبار السن والرضع والمصابين بضعف شديد. (Betty & Gilbert, 1980)

***Pseudomonas aeruginosa*-5-1-5-3:**

يحتوي جنس *Pseudomonas* على أكثر من 140 نوعاً، معظمها تطفلي. ويرتبط أكثر من 25 نوعاً مع البشر، ويسبب نوعين منها فقط (*P.mallei* & *P.pseudomallei*) أمراض محددة للإنسان وهي الرعام (Glanders) والراغوم (Meliodosis) ، وتمثل *P.aeruginosa* و *P.maltophilia* حوالي 80 % من الأنواع السريرية التي تم التعافي منها، تحظى *P.aeruginosa* باهتمام كبير بسبب تكرار تسببها للعديد من الأمراض التي تصيب البشر. يمكن لهذه البكتيريا العيش في مختلف البيئات، وتوجد في معظم البيئات الرطبة مع الحد الأدنى من الاحتياجات الغذائية، وهي قادرة على تحمل مجموعة واسعة من درجات الحرارة (4°C to 42°C)، بالإضافة إلى أنها مقاومة لمعظم المضادات الحيوية والمطهرات. (Coburn et al 1989). أما بالنسبة للبيئة فهي عصيات هوائية، سلبية الغرام، يتراوح قياسها من 0.5 – 0.8 ميكرومتر ومن 1.5 – 3.0 ميكرومتر. الحركة عبر سوط قطبي واحد وبعض السلالات تملك من 2-3 سوط. وتتميز الأنواع من الاختبارات البيوكيميائية واختبارات تهجين الحمض النووي، تشكل هذه البكتيريا ثلاثة أشكال من المستعمرات ، وتشكل المعزولة من التربة والماء عادة مستعمرات خشنة مضطربة نوعاً ما، وتنتج هذه البكتيريا ثلاثة نماذج من الصبغات الذوابة:

1. Pyocyanin (blue – green)

Fluorescein (yellow- green) or pyoverdinin .2

Pyorubin (red – brown) (Pritchard & Vasal, 1990) .3

نادراً ما تسبب هذه البكتيريا المرض للأشخاص الأصحاء، ولكنها تشكل خطراً كبيراً على المرضى في المستشفيات، ولاسيما مع الأمراض الكامنة الخطيرة حيث أن ارتفاع معدل الوفيات المرتبطة بهذه الأمراض، هو نتيجة لمزيج من ضعف دفاعات المضيف، ومقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية، وإنتاج الأنزيمات البكتيرية والسموم خارج الخلية، ويعد هذا النوع مسؤول عن 80% من حالات العدوى التي تسببها أنواع الجنس *Pseudomonas*، ويعتبر مشكلة وخاصة للمرضى المصابين بالسرطان، التليف الكيسي، الحروق، نقص المناعة، ومتعاطي المخدرات و نسبة الوفيات التي يسببها 50%، وتشمل الإصابات التهاب الشغاف، تجرثم الدم،الالتهاب الرئوي، مضاعفات التليف الكيسي،والتهابات في المسالك البولية والجهاز العصبي المركزي، وحرق الجروح الملتهبة، التهابات الأذن، التهاب المعدة والأمعاء، التهابات العين والتهابات العضلات والعظام، والمسببات المرضية هي نقص الخلايا المتعادلة وغيرها من تلقي الأدوية المثبطة للمناعة يساهم في الإصابة، كما أن هذه البكتيريا تملك عوامل ممرضة عديدة ولكن دورها في التسبب غير واضح. ومعظم السلالات المعزولة تنتج السم A، وذيفان و ذيفان داخلي و الذي يعتبر عاملاً رئيسياً في تجرثم الدم بالإضافة لإنتاجها للأنزيمات الخارجية(الإيلاستاز، البروتياز القلوية، الفوسفوليپاز والليكوسيديين)، تعتبر البلعمة بواسطة الكريات البيض متعددة النوى من الآليات الدفاعية الهامة عند المضيف في مقاومة العدوى، وتساهم الأجسام المضادة للمستضدات الجسدية والذيفان الخارجي، وتعتبر المناعة الخلطية الآلية الرئيسية ضد العدوى، إلا في حالة مرضى التليف الكيسي على الرغم من مستويات عالية من الأجسام المضادة المنتشرة، توجد هذه البكتيريا عادة في التربة والمياه والغطاء النباتي، ويمكن أن تكون معزولة من الجلد، والحلق والبراز من الأشخاص الأصحاء، وتوجد في كثير من الأحيان في الغذاء بالمستشفيات، المصارف، صنادير المياه، أدوات التنظيف ومعدات جهاز التنفس، تنتقل من مريض لآخر عن طريق الاتصال بالمناديل أو عن طريق ابتلاع الطعام والمياه الملوثة.(Barbara,1996)(Dunn & Wunderink, 1995)

3-5-2- الفطور والخمائر المستخدمة في الدراسة:

3-5-2-1- *Penicillium digitatum*:

يتميز هذا الجنس بوجود ميسيليوم حاو سبيتا عديمة اللون، وتحمل الحوامل الكونيدية العمودية أذنابا والتي بدورها تحمل سلسلة من الكونيديا . وتكون الكونيدية غالبا خضراء عندما تكون مسمرة وفتية اللون عند النضج، يوجد في الأوساط الهوائية غالبا كما يوجد عادة في التربة، السليلوز، المواد الغذائية والحبوب، ولوحظت في الطلاء وأكوام السماد العضوي ويعتبر هذا الفطر من أكثر الأنواع التي تصيب الفاكهة حيث يعمل عن طريق انتاج الاثيلين لتسريع النضج ثم يغطي الثمرة مع الغبيرات الخضراء، مما يسبب ذبول وجفاف الفاكهة. ويعتبر هذا الجنس مسؤول عن تعفن الحمضيات الأخضر المزرق، قد يسبب هذا الفطر فرط حساسية، الإصابة بالالتهاب الرئوي ، التهاب الحويصلات الهوائية، ويعتبر سبب شائع للربو خارجي المنشأ، وتشمل الأعراض الحادة سوائل زائدة في القصبات، قد يحدث في الحالات المزمنة انتفاخ الرئة . (Crissy et al, 1995) (Tournas, 2005) (طيفور وسفر، 1990)

3-5-2-2- *Fusarium sp*:

يعتبر فطر الـ *Fusarium* من الفطريات الخيطية الموجودة بشكل واسع في التربة على النباتات مثل الأرز، البقوليات والصويا، حيث يكثر وجودها في المناطق المدارية وتحت المدارية، ويعتبر من الفطريات الممرضة للنباتات وقد تسبب بعض أنواع العدوى للإنسان مسببة له إصابات سطحية أو داخلية، يوجد عدة أنواع تابعة لهذا الجنس ومنها: *F.solani*، *F.oxysporum*، *F.chamydosporum*، *F.moniliforme*، *F.proliferatum*. فطر الـ *Fusarium* يفرز سم Mycotoxins على بعض المحاصيل مثل الذرة والأرز الذي يمكن أن يسبب سرطان المريء. (Pitt et al, 1994)

يتميز هذا الفطر بمستعمرات قطنية أو صوفية الشكل، مسطحة، ممتدة، وتنمو بشكل سريع في وسط دكستروز آغار على درجة حرارة 25م°، لون المستعمرات من الأعلى أبيض، كريمي، أسمر، أصفر، أحمر أو بنفسجي، ومن الجهة السفلية عديمة اللون أو سمراء أو بنية. (Arikan et al, 1999). يعتبر فطر الـ *Fusarium* من الفطور ذات المقاومة العالية للمضادات الفطرية، ويعتبر الـ *F.solani* أكثرها مقاومة، فهي تحتاج لتراكيز عالية من المضادات الفطرية

.Fluconazola, Ketoconazola, Itraconazola, Voriconazola, Amphotericin B
(Dehoog *et al*, 2000)

:Candida albicans -3-2-5-3

تتنمي إلى صف الخمائر الكاذبة حيث أنها تشكل هيفات تشبه الهيفات الفطرية، وتعتبر هذه الخميرة من الفلورا الطبيعية الموجودة في جسم الإنسان وعلى جلده وفمه وفي المسالك البولية إلا أن زيادة عددها عن حد معين تسبب بعض الأمراض ويعتبر 80% من الإصابات الناتجة عن الخمائر عائدة إلى وجود هذه الخميرة وتكاثرها. (Dehoog *et al*, 2000) وتعزل هذه الخميرة من دم المصاب أو أحد سوائل الجسم وتعالج عادة بواسطة Fluconazola, Ketoconazola, Itraconazola, Voriconazola, Amphotericin B (Volk, 1999).

:Rhodotorula glutinis-4-2-5-3

الخلايا كروية الشكل أو متطاولة . ويتم التكاثر اللاجنسي بالبرعمة متعددة الجوانب، الاستقلاب تأكسدي فقط، تسبب هذه الخميرة تلونات على سطح اللحوم أو بقع وردية على المخلات، وتسبب فساد المواد الحاوية على السكر وتعمل على فسادها كشراب الليمون.

تتميز هذه الخميرة بأنها ملونة، وهي جزء من عائلة الـ Basidiomycota، يسهل التعرف عليها من المستعمرات البرتقالية / المحمرة عند النمو على وسط دكستروز آغار، نتيجة للصبغة التي تنتجها هذه الخميرة. توجد في المياه وعينات من الهواء والتربة حيث أنها قادرة على تخليص البيئة من المركبات الأزوتية بشكل جيد. (Postgate, 1994) (طيفور وسفر، 1990)

-6-3 استخدام الزيوت العطرية في حفظ أنواع مختلفة من الأغذية:

أجريت أبحاث متعددة هدفت لدراسة إمكانية استخدام الزيوت العطرية كعامل مساعد في حفظ بعض أنواع الأغذية مثل اللحوم ومنتجات الألبان وغيرها، وذلك بعد معرفة خواصها المضادة للنشاط الميكروبي، ولأسيما الممرضة منها، بالإضافة لذلك فإن الزيوت العطرية تعتبر مواد GRAS (Kabara, 1991)، بالتالي هي لا تملك أي مخاطر صحية.

في هذا الاتجاه ذكرت أبحاث عديدة استخدام كثير من أنواع الزيوت العطرية مثل زيت الزعتر البري وإكليل الجبل والنعناع البري والقرفة والقرنفل أو بعض المركبات الفعالة في هذه الزيوت مثل الـ Carvacrol و Eugenol و Thymol في حفظ بعض أنواع الأغذية مثل أنواع

متعددة من منتجات اللحوم، منتجات الألبان، الأرز، الفواكه، الخضار والأسماك، وقد تم استخدامها لمراقبة تأثيرها المثبط لنمو أنواع محددة من الأحياء الدقيقة أو لدراسة تأثيرها المثبط في الفلورا الطبيعية للأغذية المذكورة. (Burt, 2004) وفيما يلي سيتم ذكر جانب من هذه الملاحظات والخصائص المثبطة لبعض الزيوت العطرية.

استخدمت زيوت عطرية مختلفة، منها زيت الزعتر العطري، وزيت إكليل الجبل، في دراسة تأثيرها المثبط لنمو الأحياء الدقيقة الممرضة، ولنمو الفلورا الطبيعية، لأنواع مختلفة من اللحوم، فقد لوحظ أن زيت الزعتر والقرفة والقرنفل ومادة Eugenol (المستخدمة بتركيز 5 - 20 ميكروليتر/غرام) هي من أكثر المضادات الميكروبية تأثيراً في نمو الأحياء الدقيقة الممرضة، من أهمها: *Listeria monocytogenes*، *Aeromonas hydrophila*، *E.coli* و *Staphylococcus aureus* إضافة لتأثير مثبط واضح في الفلورا الطبيعية لمنتجات اللحم المختلفة. (Tsigarida et al, 2000) (Skandamis & Nychas, 2001)، وتبين أن لزيت الزعتر العطري تأثيراً مثبطاً لنمو بكتيريا *Pseudomonas putida* والفلورا الطبيعية، الموجودة في القريدس بتركيز 3% من الزيت العطري، ف لوحظ زيادة مدة طور الثبات للبكتيريا المدروسة، وانخفاض في التعداد الكلي في نهاية فترة الحفظ للعينات. (Ouattara et al, 2001).

وجد Pandit و Shelef أن لزيت إكليل الجبل العطري بتركيزي 1% و 5% تأثير واضح في تثبيط بكتيريا *Listeria monocytogenes*، وأيضاً في تثبيط نمو الفلورا الطبيعية الموجودة في السجق المبرد، حيث لوحظ زيادة مدة طور الثبات للأحياء الدقيقة وانخفاض في التعداد الكلي في نهاية فترة الحفظ للعينات المدروسة. (Pandit & Shelef, 1994)

تمكن Djenana وزملاؤه من إطالة فترة حفظ اللحم البقري المبرد حتى 20 يوماً وذلك باستخدام زيت إكليل الجبل العطري في الحد من النمو الميكروبي في اللحم وذلك باستخدام عوامل مساعدة وهي فيتامين C والأشعة فوق البنفسجية (UV) باستخدام جو تخزين معدل (Djenane et al, 2003)

أجريت دراسة لتحديد إمكانية استخدام زيت القرنفل العطري في تثبيط نمو بكتيريا *Listeria monocytogenes* في الجبن واللحم، وجد أن زيت القرنفل قادر على الحد من انتشار هذه البكتيريا الممرضة فيها (Menon & Garg, 2001)، كما وجد Hao وزملاؤه النتيجة نفسها

لزيت القرنفل وهي إعاقة لنمو بكتيريا الليستيريا في لحم البقر المبرد. (Hao et al, 1998)، كما لوحظ تأثيراً مثبطاً لزيت الزعتر العطري في بكتيريا *Listeria monocytogenes* عند دراسة تأثيره على البكتيريا المذكورة في لحم الخنزير المفروم. (Aureli et al, 1992)، كما توصل لنفس النتيجة الأخيرة لزيت الزعتر العطري عند معاملة سطح لحم البقر المبرد به. (Leuschner& Ielsch, 2003)

كما استخدمت الزيوت العطرية في حفظ مختلف أنواع الأغذية، حيث لوحظ تأثيراً مثبطاً لبعض الزيوت العطرية والمستخلصات النباتية ومنها زيت الزعتر وإكليل الجبل على نمو البكتيريا الممرضة مثل بكتيريا *Listeria monocytogenes* و *Salmonella typhi* وغيرها الموجودة في الشوكولا. (Kotzekidon et al, 2008)

وكما ذكر سابقاً، أن لمكونات الغذاء تأثير واضح في فعالية استخدام الزيوت العطرية في حفظ الأغذية، فقد تبين بشكل عام أن التأثير المثبط للزيوت العطرية المختلفة ينخفض في الأغذية الغنية بالدهن، فعلى سبيل المثال، فإن التأثير المثبط لزيت الـ Oregano بتركيز 0.5 ميكروليتر/غرام عند استخدامه لحفظ أنواع لحوم الأسماك ذات المحتوى القليل من الدهن أكثر منه عند استخدامه لحفظ أنواع لحوم الأسماك ذات المحتوى العالي من الدهن مثل السلمون. (Mejlholm & Dalgaard, 2002)

كما لوحظ أن لزيت الزعتر وزيت إكليل الجبل المستخدمان بتركيز 10 ميكروليتر/غرام في مياه غسيل الخضراوات تأثير مثبط واضح في الفلورا الطبيعية والبكتيريا الممرضة الموجودة فيها. (Wan et al, 1998) (Singh et al, 2002)

تمتلك مادة الكارفانول أيضاً تأثيراً مثبطاً واضحاً لنمو الفلورا الطبيعية الموجودة على سطح بعض الفواكه عند استخدامه بتركيز 0.15 ميكروليتر/غرام في محلول الغمر. (Roller & Seedhar, 2002)

4- الجزء العملي:

4-1- المواد:

4-1-1- المواد والأجهزة المستخدمة:

أجري البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانات الحيوية وقسم علوم الأغذية، واستخدمت المواد والأجهزة التالية:

- 1- جهاز استخلاص الزيوت العطرية بواسطة الجرف بالبخر.
 - 2- جهاز الكروماتوغرافيا الغازية (شركة Agilent Technologies، والطراز 7890A GC system)
 - 3- جهاز مطياف الكتلة (شركة Agilent Technologies، والطراز 5975 inert MSD)
 - 4- عمود شعري HP5 بطول 30 م، قطر 0.32 مم وسماكة الطبقة 0.25 ميكرومتر.
 - 5- غرفة عزل.
 - 6- أدوات مخبرية.
 - 7- أوساط الآغار المغذي ودكستروز البطاطا.
 - 8- توين 20 (مادة استحلاب).
- ##### 4-1-2- النباتات المدروسة:

الجدول (13) يوضح النباتات العطرية المستخدمة في الدراسة.

النبات	الاسم الانكليزي	الاسم العلمي	الجزء المستخدم
إكليل الجبل	Rosemary	Rosmarinus officinalis	الأوراق
الزعتر	Thyme	Thymus vulgaris	الأوراق

4-1-2-1- جمع النباتات المدروسة:

أجريت الدراسة على نوعين من النباتات البرية المتوفرة في سورية وهما نباتي الزعتر البري وإكليل الجبل. حيث جمعت العينات المدروسة من المنطقة الساحلية في سورية خلال شهر آذار من عام 2009.

4-2-2-1- تجفيف النباتات المدروسة:

أخذت أوراق النباتات، وجففت في الهواء بمعزل عن أشعة الشمس وبدرجة حرارة الغرفة ثم طحنت يدوياً للحصول على أكبر كمية ممكنة من الزيت العطري الموجود في الأوراق.

4-3-1-4- العزلات الميكروبية المستخدمة في الدراسة:

4-1-3-1- البكتيريا:

اختيرت خمس أنواع بكتيرية ممرضة والمسببة لفساد الأغذية، حيث اختير نوع واحد موجب الغرام وأربع أنواع سالبة الغرام، والجدول (14) يوضح الأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة.

الجدول (14) يوضح الأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة.

المصدر	الوسط	اسم العزلة البكتيرية
مديرية الصحة	Braid parker Agar	<i>Staphylococcus aureus</i>
مديرية الصحة	XLD Agar	<i>Salmonella typhi</i>
مديرية الصحة		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
مديرية الصحة	Cetrimide Agar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
مديرية الصحة	EMB Agar	<i>Escherichia coli</i>

4-2-3-1- الفطور والخمائر:

اختير نوعين من الفطور ونوعين من الخمائر المسببة لفساد الأغذية، والجدول (15) يوضح أنواع الفطور والخمائر المستخدمة في الدراسة.

الجدول (15) يوضح أنواع الفطور والخمائر المستخدمة في الدراسة.

النوع	المصدر
<i>Penicillium digitatum</i>	مخابر التقانات الحيوية
<i>Fusarium sp</i>	مخابر التقانات الحيوية
<i>Candida albicans</i>	مخابر التقانات الحيوية

2-4- الطرائق:**1-2-4- استخلاص الزيوت العطرية الطيارة للنباتات المدروسة: (AOAC,2000)**

استخدمت طريقة التقطير بالبخار وذلك بواسطة جهاز الاستخلاص المبين في الشكل كما يلي:

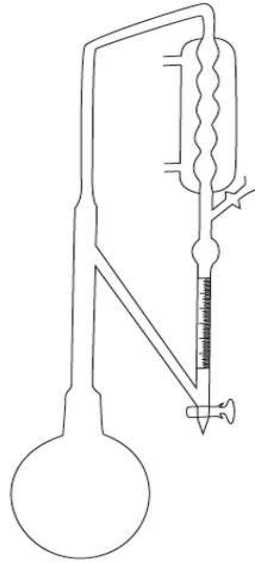


Figure 1. Clevenger-type apparatus — Appareil de type Clevenger.

- 1- وضع 100 غرام من أوراق النبات المستخدم الجافة والمطحونة في حوالة الاستخلاص وغمرت بالماء المقطر.
- 2- سخنت العينة المغمورة بالماء المقطر حتى درجة الغليان، حتى يتصاعد بخار الماء حاملاً معه الزيت العطري الطيار، وتستمر هذه العملية لمدة 3 ساعات.
- 3- يستقبل بخار الماء الممتزج مع المكونات الطيارة المكونة للزيت العطري في مكثف مائي، ويستقبل السائل المكثف في أنبوب مدرج خاص حيث ينفصل الزيت العطري عن الماء لطبقتين ثم حفظ الزيت العطري على درجة حرارة 4م°.

2-2-4- التعرف على مكونات الزيوت العطرية بواسطة جهاز (GC-MS):

حللت عينتي الزيتين العطريين باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية المزود بوحدة مطياف الكتلة المزود بمكتبة لمعظم المركبات العطرية، واستخدمت درجة حرارة للحاقن بلغت 250م°، واستخدم البرنامج الحراري التالي: 70م° لمدة دقيقتين في بداية التحليل، ثم رفعت

درجة حرارة العمود بمعدل 20°م لكل دقيقة حتى الوصول لحرارة 270°م، حيث أن مدة تحليل العينة ساعة واحدة.

حضرت العينة بأخذ 80 ميكروليتر من الزيت العطري، وحله بـ 320 ميكروليتر من الهكسان، ثم حقنه في حاقن العينة بجهاز الكروماتوغرافيا الغازية على حرارة 250°م.

3-2-4- الزرع الميكروبي: طريقة الأقراص: (NCCLS,2000)

استخدمت طريقة Agar disc diffusion حسب الخطوات التالية:

- 1- تحضير تخافيف من كل زيت عطري من 1%- 2%- 3%- 4%- 5%- 6%- 7% وذلك بحلها بالماء باستخدام عامل استحلاب هو (التوين 20)، وبمعدل خمس مكررات لكل تركيز.
- 2- غمس الأقراص السيللوزية بالتراكيز المحضرة ووضعها على سطح الأوساط التي تم زرع الأحياء الدقيقة المذكورة في الفقرة 3-1-3 عليها (المنشطة قبل 24 ساعة).
- 3- التحضين لمدة 24 ساعة على حرارة 37°م للبكتيريا، ولمدة 48-72 ساعة على حرارة 30°م للفطور والخمائر.
- 4- قياس قطر دائرة التثبيط (مم).

4-2-4- استخدام الزيوت العطرية في حفظ اللحم:

اختيرت مادة اللحم لدراسة تأثير كل من زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين على مدة حفظ اللحم المبرد المعروف بقصر مدة حفظه التي لا تزيد عن ثلاثة أيام.

أجري الاختبار في مخابر الهيئة العامة للتقانات الحيوية حسب الخطوات التالية:

- 1- جمع عينات اللحم حيث اختير لحم الغنم من منطقة الفخذ، كما جمعت العينات من منطقة ريف دمشق، حيث وضعت في عبوات زجاجية محكمة الإغلاق معقمة مسبقاً
- 2- أجري تعداد كلي لعينات اللحم في اليوم الأول (Zero time).
- 3- حضرت عينات اللحم بتقطيعها لقطع بوزن 2 غ.
- 4- حضر التركيزين 3% و5% من الزيتين العطريين المدروسين.
- 5- غطست قطع اللحم بالتركيزين 3% و5% لمدة 5 دقائق، ولفت بورق القصدير المعقم وخننت في البراد على درجة حرارة 4°م.

6- تم مراقبة التعداد الكلي لمدة 12 يوماً لكل من عينات اللحم المعاملة بالزيتين العطرين والشاهد، وذلك بأخذ 2 غ من اللحم ويضاف لها 18 مل من ماء الببتون، وحضرت التخافيف المناسبة، ولوحظت خواص اللحم الحسية حتى الوصول لمرحلة الفساد.

3-4- التحليل الإحصائي:

أجري تحليل التباين ANOVA كتجربة عاملية بتصميم قطاعات عشوائية كاملة، وأتبع باختبار Tukey (تشوكي) على مستوى ثقة 0.05 ($P \leq 0.05$) لتحديد الفروق المعنوية بين المستويات، وتم إجراء التحليل باستخدام برنامج Minitab14.

5- النتائج والمناقشة:

5-1- نتائج تحليل المكونات العطرية:

5-1-1- مكونات زيت الزعتر العطري:

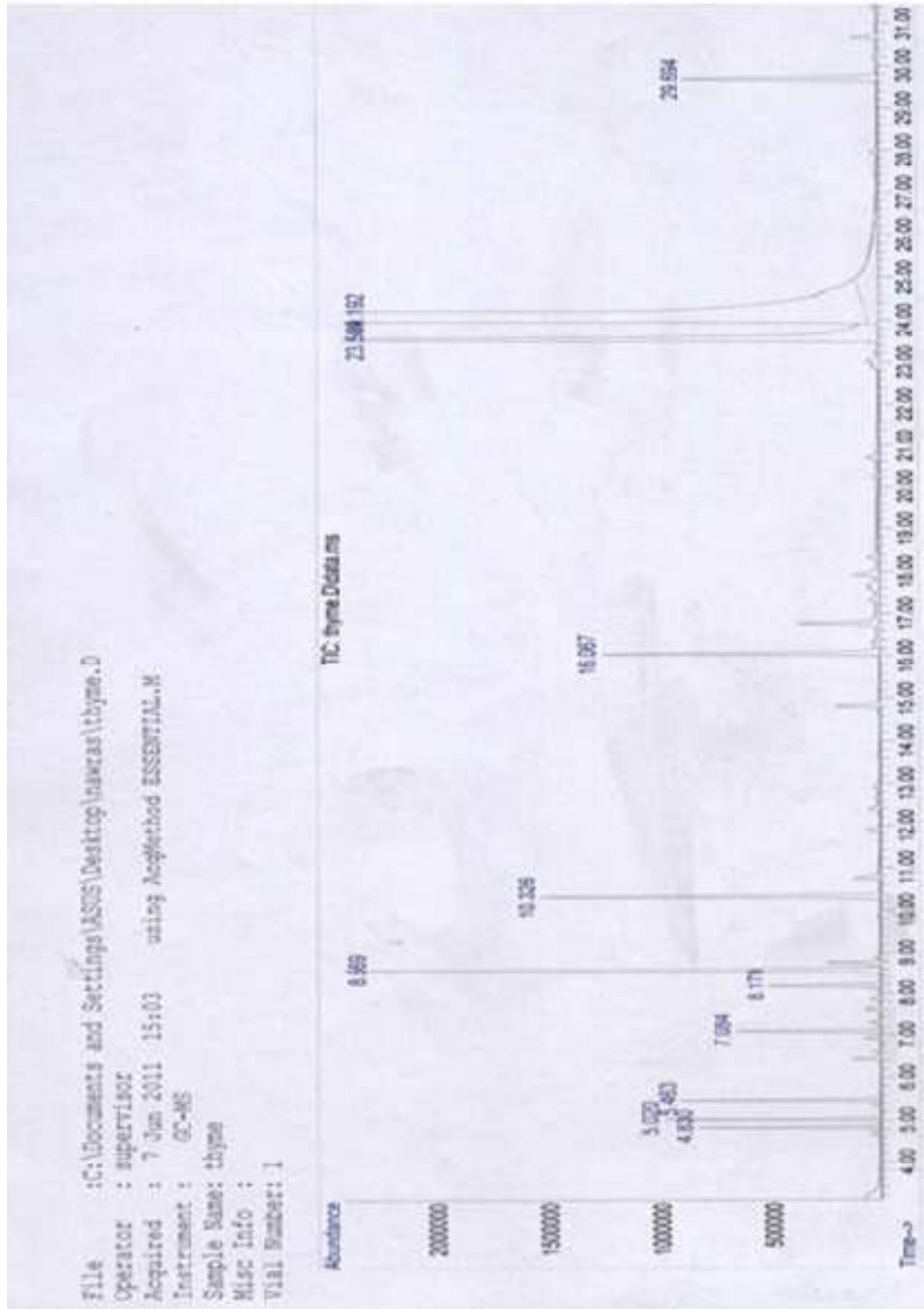
حللت مكونات زيت الزعتر العطري باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية المزود بمطياف الكتلة (GC-MS)، والجدول (16) يوضح النسب المئوية لمكونات زيت الزعتر العطري.

الجدول (16) يبين النسب المئوية لمكونات زيت الزعتر العطري.

اسم المركب	النسبة %	صفته (USDA)
Thujene	0.79	-
α -pinene	0.96	Antimicrobial
Camphene	0.97	-
β -Myrcene	0.87	Antimicrobial
α -Terpinene	0.76	-
p-Cymene	7.3	Antimicrobial
γ -Terpinene	2.48	-
Borneol	2.12	-
Thymol	8.92	Antimicrobial
Carvacrol	73.1	Antimicrobial
β -Caryophyllene	1.73	-
المجموع	100	-

يلاحظ من الجدول (16) أن زيت الزعتر المستخدم في الدراسة يتكون من 11 مركباً عطرياً، اختلفت نسبها بشكل كبير، حيث بلغت نسبة المركبات العطرية التي تملك تأثيراً مثبط لنمو الأحياء الدقيقة حوالي 90%، حيث تفوق كل من مركبي الكارفاكرول والثايمول على مكونات الزيت العطري الأخرى، وشكلت حوالي 73% و 9% على التوالي، وهذا يتوافق مع ما ذكره Raal و Orav عام 2005، مع العلم أن كل من المركبين يملكان خواصاً مضادة لنمو الأحياء الدقيقة حسب الـ USDA 2004، يعتقد أن معظم التأثير المثبط لزيت الزعتر العطري يعود لمركبي الكارفاكرول والثايمول، حيث نسبت الكثير من الأبحاث في هذا المجال التأثير المثبط لنمو الأحياء الدقيقة لهذين المركبين، نظراً لنسبتهما العالية في الزيت العطري، وهذا

يتوافق مع ما ذكره Olasupo وزملاءه عام 2003، توجد مركبات عطرية أخرى في زيت الزعتر العطري ولكن بنسب منخفضة ولكن لا يمكن إهمالها نظراً لتصنيفها كمضادات



ميكروبية حسب الـ USDA 2004، وهي الـ p-Cymene بنسبة تجاوزت 7%، β -Myrcene و α -pinene بنسبة أقل من 1%.

الشكل (2) يبين نتائج تحليل مكونات زيت الزعتر العطري باستخدام (GC-MS)

5-1-2- مكونات زيت إكليل الجبل العطري:

حللت مكونات زيت إكليل الجبل العطري باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية المزود بمطياف الكتلة (GC-MS)، والجدول (17) يوضح النسب المئوية لمكونات زيت إكليل الجبل العطري.

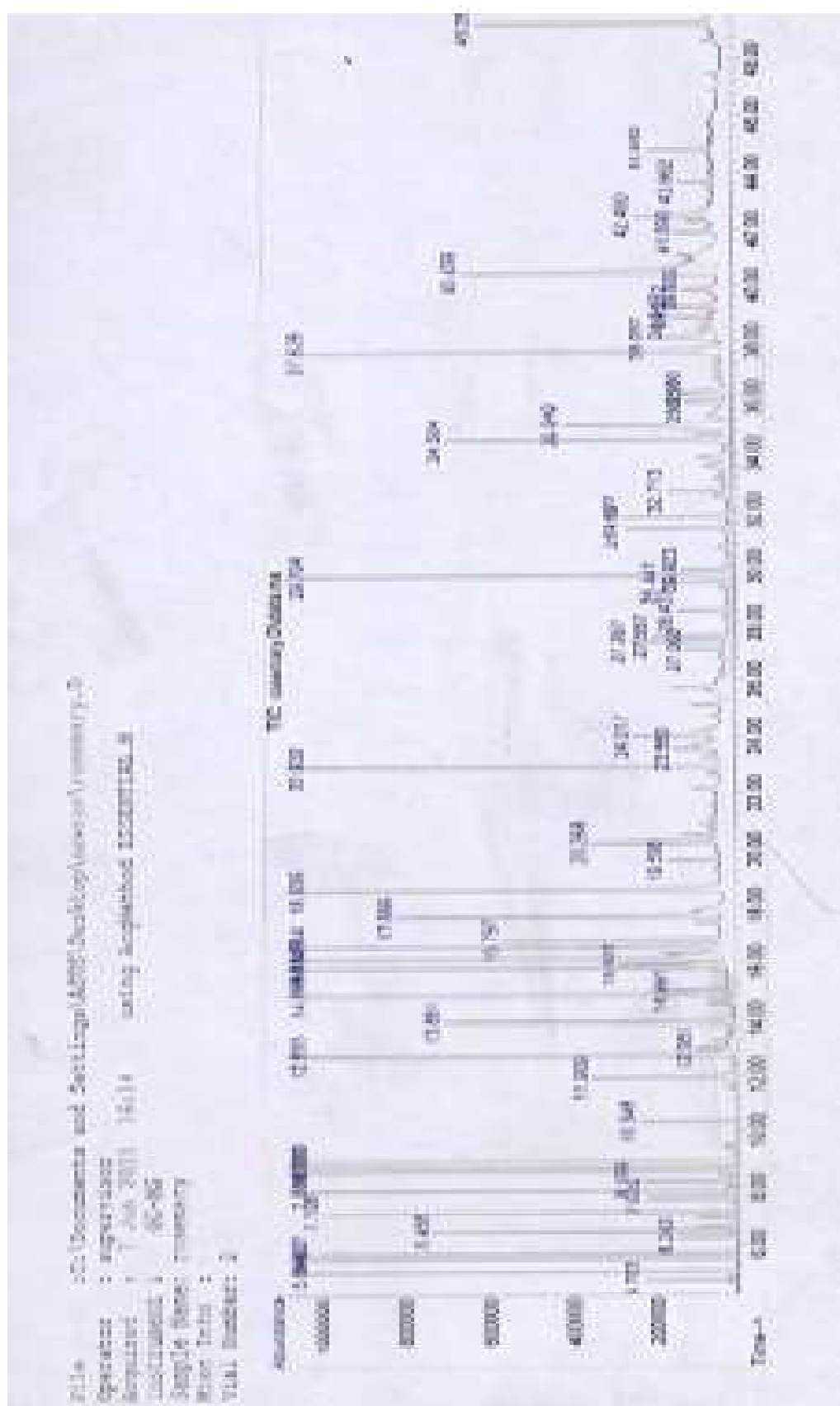
الجدول (17) يبين النسب المئوية لمكونات زيت إكليل الجبل العطري العطري.

اسم المركب	النسبة %	صفته (USDA)
Tricyclene	0.18	-
α-pinene	12.25	Antimicrobial
Camphene	3.78	-
Verbenene	1.07	-
m-Cymene	0.15	Antimicrobial
β -Pinene	0.76	-
β -Myrcene	1.13	Antimicrobial
α -phellandrene	0.33	Antimicrobial
Delta. 3-Carene	1.74	-
α -Terpinene	0.31	-
p-Cymene	3.2	Antimicrobial
Limonene	4.72	Antimicrobial
1.8-Cineole	10.75	Antimicrobial
γ -Terpinene	0.32	-
α -Terpinolene	0.79	-
1.6-Octadien-3-ol	4.14	-
Nonanal	0.13	-
Chrysanthenone	1.23	-
Camphor	12.29	-
1.5.8-p-Menthatriene	0.24	-
Pinocarvone	0.38	-
Borneol	8.89	Antimicrobial
Bicyclo heptan-3- one	4.31	-
4-Terpineol	0.8	Antimicrobial
3-Cyclohexene-1-methanol	1.43	-
1-Verbenon	2.97	-
Propanal	0.45	-
Bornyl acetate	4.6	-
Thymol	0.19	Antimicrobial
Carvacrol	0.48	Antimicrobial
Camphene	0.56	-
α -Copaene	0.3	-
Delta. 3-Carene	0.19	-

-	0.23	Methyleugenol
-	2.3	β -Caryophyllene
-	0.41	α -Caryophyllene
-	0.48	5.9-Undecadien-2-one
-	2.47	α -Amorphene
-	1.24	γ -Muroloene
-	1.1	Delta-Cadinene
-	0.16	Calacorene
-	0.16	Germacrone
-	3.23	Caryophyllene Oxide
-	0.55	Viridiflorene
-	0.34	Cadina-1.4-Diene
-	0.15	Cadalene
-	0.49	β -Bisabolene
-	0.25	Valerenal
-	0.15	Methyl palmitate
-	98.77	المجموع

يلاحظ من الجدول (17) أن عدد مكونات الزيت العطري بلغ تسعة وأربعون مركباً، اختلفت في نسبة وجودها في الزيت العطري، حيث تراوحت بين 0.13 – 12.3%، ويعود السبب لعدة عوامل وراثية وبيئية، تجاوزت نسبة كل من مركبي α -pinene و Camphor 12% لكل منهما، وجاء كل من مركبي 1.8-Cineole و Borneol في المرتبة الثانية بنسبة تجاوزت 10% و 8% على التوالي، وهذا يتوافق مع ما ذكرته العديد من الأبحاث التي درست التركيب الكيميائي لزيت إكليل الجبل العطري، حيث كانت مركبات α -pinene، Camphor، 1.8-Cineole و Borneol هي المركبات العطرية الأساسية المكونة لزيت إكليل الجبل العطري وهذا يتوافق مع نتائج Jiang وزملاؤه عام 2011، و Heravi وزملاؤه عام 2011، و Deferara وزملاؤه عام 2003، وجد أيضاً مركبات عطرية أخرى ذات أهمية كمضاد ميكروبي مثل مركبات p-Cymene، Limonene، β -Myrcene، 4-Terpineol، Thymol، Carvacrol، m-Cymene، α -phellandrene بنسب تراوحت بين 0.15 – 4.7%، تمتلك المركبات السابقة الذكر خواص مضادة لنمو الأحياء الدقيقة حسب الـ USDA، فهي تشارك في منح زيت إكليل الجبل العطري صفاته المضادة لنمو الأحياء الدقيقة، بلغت نسبة المركبات العطرية التي تمتلك خواص مضادة لنمو الأحياء الدقيقة حوالي 42% فقط من كامل مكونات زيت إكليل الجبل العطري، وهذا ما يفسر ضعف خواصه المثبطة لنمو الأحياء الدقيقة

نسبياً مقارنة بزيت الزعتر العطري، حيث بلغت نسبة المركبات العطرية المثبطة لنمو الأحياء الدقيقة فيه أكثر من 90% من كامل مكونات الزيت العطري.



الشكل (3) يبين نتائج تحليل مكونات زيت إكليل الجبل باستخدام (GC-MS)

2-5- نتائج دراسة التأثير المثبط للزيوت العطرية:

5-2-1- نتائج دراسة التأثير المثبط للزيوت العطرية في نمو البكتيريا:

أظهر زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين تأثيرات مختلفة ومتفاوتة في نمو البكتيريا الممرضة المستخدمة في الدراسة، وقد كانت هذه الاختلافات راجعة لعدة عوامل هي نوع الزيت العطري المستخدم، التراكيز المتدرجة المستخدمة من 1 – 7%، نوع البكتيريا، سلوك البكتيريا اتجاه صبغة غرام (سالبة أو موجبة الغرام)، والجدول (18) والجدول (19) يوضحان متوسطات أقطار التثبيط لزيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين.

الجدول (18) متوسطات أقطار التثبيط لزيت الزعتر لنمو البكتيريا المدروسة (مم)*

التراكيز	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Sal.typhi</i>	<i>K.pneumoniae</i>
%1	6.4±0.22	7.0±0	5.7±0.27	5.9±0.22	0
%2	7.1±0.22	7.7±0.27	6.1±0.22	6.6±0.41	6.0±0
%3	8.1±0.22	9.2±0.27	6.4±0.22	7.0±0	6.4±0.22
%4	9.2±0.45	9.5±0.35	7.4±0.22	7.4±0.22	7.0±0
%5	10.7±0.27	9.7±0.27	6.9±0.22	8.1±0.22	7.4±0.22
%6	11.9±0.42	9.8±0.27	7.9±0.22	8.0±0.5	9.9±0.55
%7	21.8±1.3	10.4±0.42	8.1±0.22	8.8±0.27	11.3±0.27

*كل قراءة تمثل متوسط لخمس مكررات.

يبين الجدول (18) التأثير المثبط لزيت الزعتر العطري في نمو خمس أنواع بكتيرية، تشمل نوع واحد موجب الغرام هو *Staphylococcus aureus* وأربعة أنواع سالبة الغرام، يتبين من الجدول السابق أن قطر التثبيط تناسب طردياً مع ارتفاع التركيز بالنسبة لجميع أنواع البكتيريا المدروسة لكن البكتيريا الموجبة الغرام كانت أكثر حساسية من سالبة الغرام، وكان تدرج الحساسية لزيت الزعتر العطري كما يلي *Staphylococcus aureus* □ *Klebsiella pneumoniae* □ *Pseudomonas aeruginosa*، حيث أن بكتيريا *Staphylococcus aureus* كانت أكثر البكتيريا حساسية اتجاه تأثير زيت الزعتر العطري مقارنة بالأنواع البكتيرية الأخرى، وهذا يتوافق مع ما توصل إليه كل من Smith وزملاؤه عام

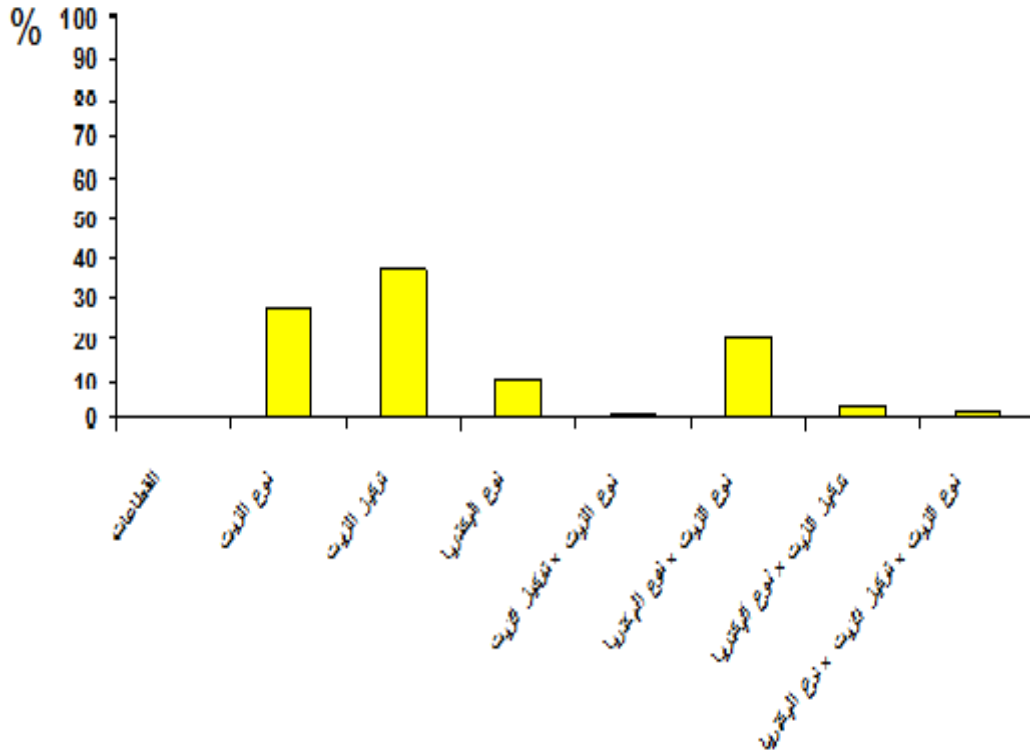
1998 و Nikaido عام 1996، حيث ذكرا أن البكتيريا موجبة الغرام هي أكثر حساسية غالباً من البكتيريا سالبة الغرام، وتتوافق النتائج في الجدول السابق مع الدراسات المرجعية، بلغ قطر التثبيط لبكتيريا *Staphylococcus aureus* عند تركيز 1% 6.4 مم، وارتفع بشكل تدريجي حتى بلغ حوالي 22 مم عند استخدام تركيز 7%، وهذا يتوافق مع نتائج Sagdic عام 2003 ونتائج Valero و Salmeron عام 2003، جاءت بكتيريا *E.coli* وبكتيريا *Klebsiella pneumoniae* في الدرجة الثانية من حيث الحساسية اتجاه زيت الزعتر العطري حيث بلغ قطر التثبيط لبكتيريا *E.coli* عند تركيز 1% 7 مم، وتزايد بشكل تدريجي حتى بلغ حوالي 10.5 مم عند تركيز 7%، وقد أظهرت التراكيز بين 3-6% أقطار تثبيط متقاربة تراوحت بين 9.2-9.8 مم، وهذا يتوافق مع ما توصل إليه Valero و Salmeron عام 2003، يبين الجدول السابق أن بكتيريا *Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa* أكثر البكتيريا مقاومة لزيت الزعتر العطري، حيث بلغ قطر التثبيط باستخدام تركيز 7% أكثر من 8 مم، يلاحظ أنه لم يكن هناك تفاوت كبير بين قطر التثبيط بين التركيزين 1% و 7% حيث تراوحت بين 6-8 مم وهذا بسبب المقاومة التي أظهرها هذان النوعان من البكتيريا اتجاه تأثير زيت الزعتر العطري، وقد لوحظ تزايد تدريجي في أقطار التثبيط بين التركيزين 1-7%، وهذا يتوافق مع نتائج Valero و Salmeron عام 2003، يعود معظم التأثير المثبط لزيت الزعتر العطري لمركب الكارفادول المصنف على أنه مضاد ميكروبي حسب الـ USDA عام 2004، وأثبتت العديد من الدراسات أنه يملك تأثيراً مثبطاً قوياً، فضلاً عن كونه يشكل النسبة العظمى من مكونات زيت الزعتر العطري حيث وصلت إلى حوالي 73%.

الجدول (19) متوسطات أقطار التثبيط لزيت إكليل الجبل لنمو البكتيريا المدروسة (مم)*

التراكيز	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhi</i>	<i>K.pneumoniae</i>
%1	5.0	6.1±0.22	0	6.1±0.22	0
%2	5.0±0.27	6.3±0.27	4.0±0	6.6±0.22	6.6±0.22
%3	5.5±0	6.8±0.27	4.4±0.22	7.1±0.22	7.3±0.27
%4	5.6±0.27	7.0±0	5.1±0.22	9.1±0.22	9.0±0
%5	5.9±0.22	7.6±0.41	5.5±0.35	10.0±0	9.4±0.22
%6	7.0±0.22	8.6±0.22	6.2±0.27	11.4±0.22	10.0±0.35
%7	9.1±0.45	9.3±0.45	7.6±0.41	12.4±0.22	11.2±0.45

*كل قراءة تمثل متوسط لخمس مكررات.

يبين الجدول السابق التأثير المثبط لزيت إكليل الجبل العطري في نمو خمس أنواع من البكتيريا معبراً عنه بقطر التثبيط المتكون، يبين الجدول السابق أن قطر التثبيط تناسب طردياً مع ارتفاع التركيز بالنسبة لجميع أنواع البكتيريا المدروسة، وكان تدرج الحساسية لزيت إكليل الجبل العطري كما يلي *Salmonella typhi* □ *Klebsiella pneumoniae* □ *E.coli* □ *Staphylococcus aureus* □ *Pseudomonas aeruginosa*، تبين أن بكتيريا *Salmonella typhi* كانت أقلها مقاومة للتأثير المثبط لزيت إكليل الجبل العطري، حيث بلغ قطر التثبيط حوالي 6 مم عند استخدام تركيز 1% وتزايد تدريجياً حتى بلغ 12.4 مم عند التركيز 7% من الزيت العطري، وتراوح قطر التثبيط بين 7-11.5 مم عند استخدام التراكيز من 2-6% ويلاحظ أن هناك تزايد تدريجي في قطر التثبيط مع زيادة التركيز، وهذا يتوافق مع نتائج Krajčová عام 2008 و Jiang وزملاؤه عام 2011، ويبين الجدول السابق أيضاً أن أكثر بكتيريا مقاومة لزيت إكليل الجبل العطري كانت بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* حيث أنه لم يسجل أي تأثير مثبط عند استخدام تركيز 1%، وبلغ قطر التثبيط 4 مم عند استخدام تركيز 2% وتزايد تدريجياً وبلغ 7.6 مم عند استخدام تركيز 7%، كما يتبين من الجدول السابق أن انخفاض قطر التثبيط لبكتيريا *Pseudomonas* يدل على مقاومة عالية لهذه البكتيريا مقارنة بأنواع البكتيريا الأخرى، وهذا يتوافق مع نتائج Cox عام 2000 حيث توصل إلى أن هذه البكتيريا كانت الأكثر مقاومة بين مجموعة من البكتيريا الممرضة، يوضح الجدول

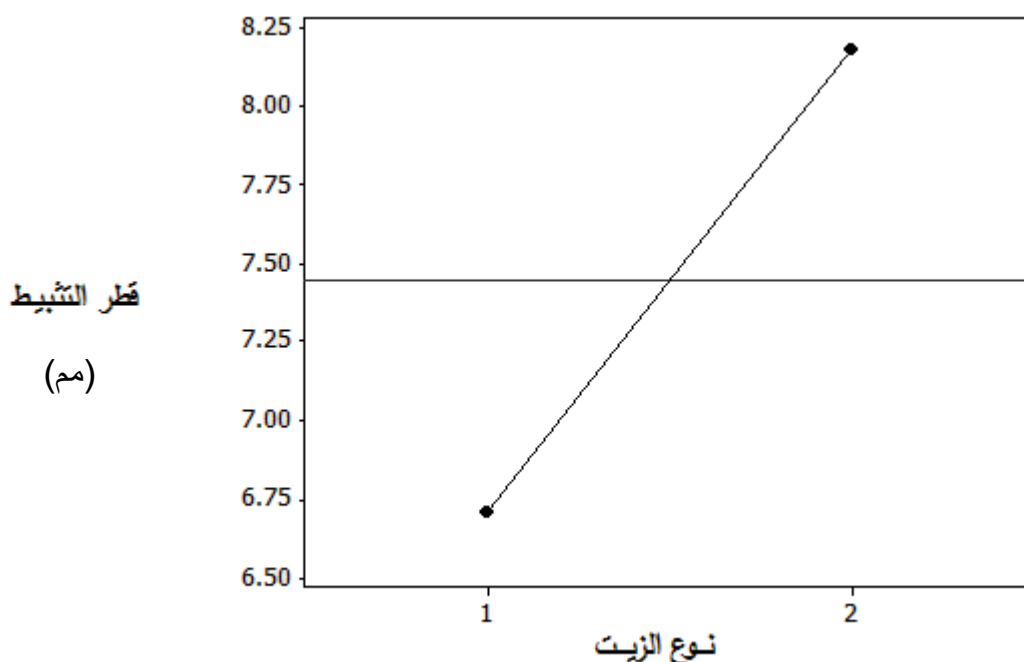


الشكل (4) يوضح توزيع التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر التنشيط.

نلاحظ وجود فروق معنوية بين مستويات العوامل المدروسة، وتبين أن معظم التباين في أقطار التنشيط المتحصل عليها كان ناتجاً عن تأثير نوع الزيت وتركيزه، حيث ساهما بنسبة تزيد عن 60%، وساهم متغير نوع البكتريا بـ 10% فقط من التباين في أقطار التنشيط، ويعود السبب في انخفاض تأثير متغير نوع البكتريا نسبياً إلى أن أربعة أنواع من أنواع البكتريا الخمسة المدروسة هي بكتريا سالبة الغرام، وبالتالي هي تمتلك سلوكاً متشابه نسبياً اتجاه الزيوت العطرية المستخدمة في الدراسة.

2-1-2-5- تأثير نوع الزيت في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية:

أجرت دراسة إحصائية لتحديد تأثير نوع الزيت العطري في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية والشكل (5) يبين نتائج هذه الدراسة.



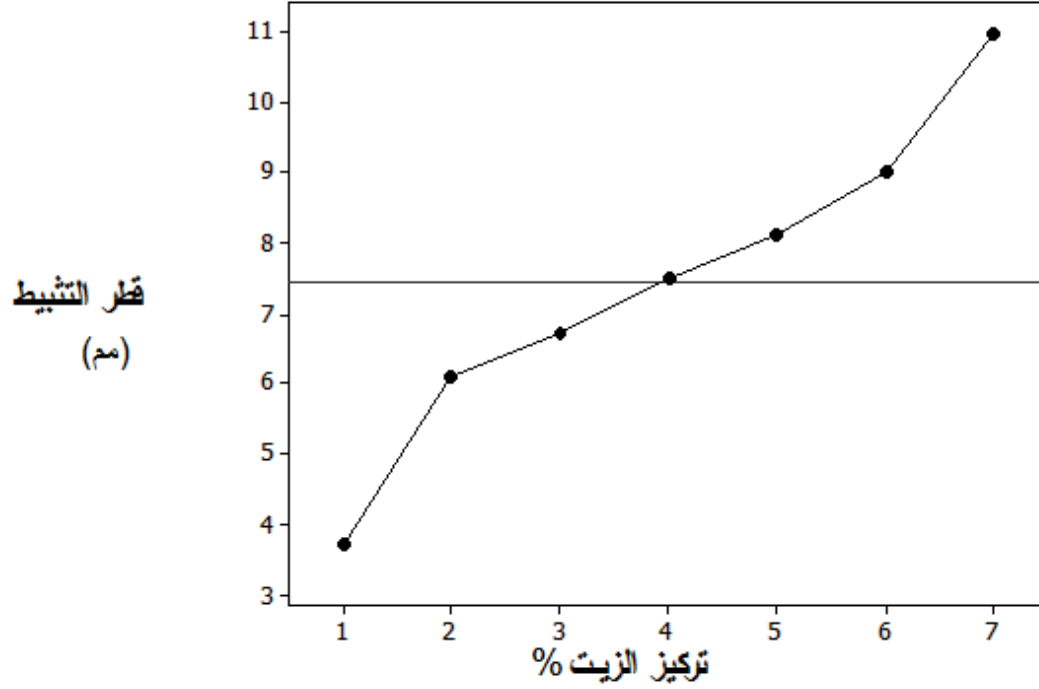
الشكل (5) يوضح تأثير نوع الزيت في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية المدروسة.

حيث: 1- زيت إكليل الجبل، 2- زيت الزعتر

أجريت مقارنة بين التأثير المثبط لكل من زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين في نمو البكتريا المدروسة، فتبين بالتحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين أقطار التثبيط لنوعي الزيتين العطريين، حيث أن زيت الزعتر العطري يملك تأثيراً مضاداً لنمو البكتريا أكبر منه في زيت إكليل الجبل العطري، كما هو موضح في الشكل (3)، ويعود السبب إلى أن حوالي 40% فقط من مكونات زيت إكليل الجبل العطري هي مركبات عطرية ذات تأثير مضاد لنمو الأحياء الدقيقة، مقارنة بحوالي 90% لزيت الزعتر العطري.

3-1-2-5- تأثير تركيز الزيت في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية :

أجري التحليل الإحصائي لمعرفة تأثير تركيز الزيت في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية المدروسة، ويبين الشكل (6) نتائج هذه الدراسة.

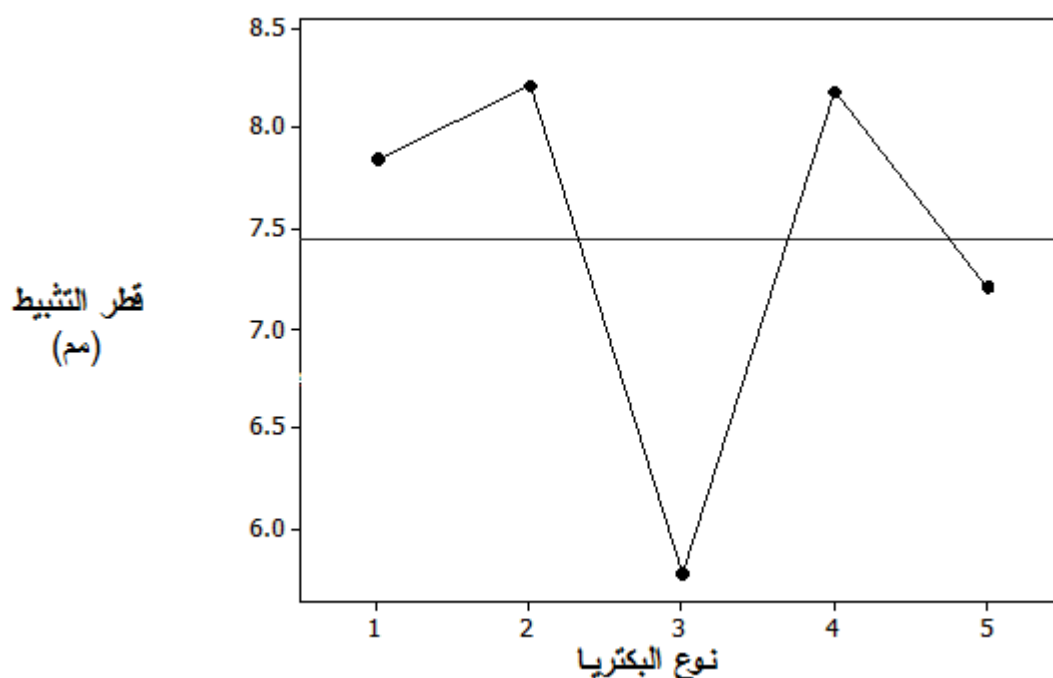


الشكل (6) يبين تأثير تركيز الزيت في قطر التثبيط للأنواع البكتيرية المدروسة.

أظهر التحليل الإحصائي فروقاً معنوية بين التراكيز المستخدمة من زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين، ويبين الشكل السابق تزايد قطر التثبيط لنمو الأنواع البكتيرية مع زيادة تركيز الزيت المستخدم.

4-1-2-5- تأثير نوع البكتيريا في قطر تثبيط الأنواع البكتيرية:

أجري التحليل الإحصائي لتحديد الفروق المعنوية بين الأنواع البكتيرية المدروسة وأُتبع باختبار Tukey لتحديد الفروقات المعنوية بين المستويات، ويبين الشكل (7) تأثير عامل نوع البكتيريا المدروسة في قطر التثبيط المتكون.



الشكل (7) يوضح تأثير نوع البكتيريا في قطر تثبيط نمو الأنواع البكتيرية. حيث: (1) *Staphylococcus aureus* - (2) *E. coli* - (3) *Pseudomonas aeruginosa* - (4) *Salmonella typhi* - (5) *Klebsiella pneumoniae*

أظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين الأنواع البكتيرية المختلفة بشكل عام، ولكن عند إجراء اختبار Tukey لتحديد الفروق المعنوية بين المستويات تبين عدم وجود فروق معنوية بين النوعين *E. coli* و *Salmonella typhi*، كما يبين الشكل السابق أن بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت أكثر أنواع البكتيريا مقاومة وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث Cox عام 1999، ويعود ذلك لطبيعة الجدار المحيط بخلايا هذه البكتيريا، وتبين أن كل من بكتيريا *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhi* و *Klebsiella pneumoniae* هي الأقل مقاومة، ولكن كما ذكر سابقاً أن بكتيريا *Staphylococcus aureus* كانت الأقل مقاومة لزيت الزعتر العطري ولكنها أظهرت مقاومة لتأثير زيت إكليل الجبل العطري، أما النوعين الآخرين كانا يملكان سلوكاً متشابهاً اتجاه كل من الزيتين.

5-2-2- نتائج دراسة التأثير المثبط للزيوت العطرية في الفطور الخمائر:

أظهر زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين تأثيرات مختلفة ومتفاوتة في نمو الفطور والخمائر المستخدمة في الدراسة، وقد كانت هذه الاختلافات راجعة لعدة عوامل هي نوع الزيت العطري المستخدم، التراكيز المتدرجة المستخدمة من 1 - 7%، نوع الفطر أو الخميرة

المدرسة، والجدولين (21) و(22) يوضحان متوسطات أقطار التثبيط لزيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين.

الجدول (21) متوسطات أقطار التثبيط لزيت الزعتر في الفطور والخمائر المدروسة (مم)*

التركيز	<i>Penicillium Digitatum</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Rhodotorula glutins</i>
%1	6.0±0.22	6.3±0.27	6.0±0	5.0±0
%2	7.0±0	8.1±0.22	6.0±0	5.3±0.27
%3	8.1±0.22	9.1±0.22	7.3±0.27	6.0±0
%4	8.4±0.22	9.5±0	7.4±0.27	6.9±0.22
%5	9.3±0.27	9.8±0.27	7.7±0.55	7.5±0.5
%6	9.7±0.27	12.2±0.27	7.9±0.22	8.8±0.45
%7	12.8±0.27	15.2±0.45	12.9±0.22	11.5±0.55

*كل قراءة في الجدول هي متوسط لخمس مكررات.

يبين الجدول السابق التأثير المثبط لزيت الزعتر العطري في نمو جنسين من الفطور هما *Penicillium digitatum* و *Fusarium sp* ونوعين من الخمائر هما *Candida albicans* و *Rhodotorula glutins*، ونلاحظ من الجدول السابق أن زيت الزعتر العطري يملك تأثيراً مثبطاً لجميع أنواع الفطور والخمائر المدروسة، ويتناسب قطر التثبيط طردياً مع التركيز المستخدم بالنسبة لجميع أنواع الفطور والخمائر المدروسة، ويمكن ترتيب أنواع الفطور والخمائر حسب حساسيتها لزيت الزعتر العطري كما يلي: *Penicillium digitatum* < *Candida albicans* < *Rhodotorula glutins*.

أظهر زيت الزعتر العطري أعلى تأثير مثبط في نمو فطر الـ *Fusarium sp* حيث بلغ قطر التثبيط 6.3 مم بتركيز 1% وتزايد بشكل تدريجي ليبلغ 15.2 مم بتركيز 7%، وهذا يتوافق مع نتائج Chebli وزملاؤه عام 2003، كما يبين الجدول السابق أن زيت الزعتر العطري يملك تأثيراً مثبطاً بفعالية متشابهة تقريباً في نمو الأنواع الثلاثة الأخرى من الفطور والخمائر، فبالنسبة لفطر *Penicillium digitatum* فقد ثبت أن زيت الزعتر العطري نموه

بتركيز 1% وسجل قطر تثبيط قدره 6 مم وتزايد تدريجياً حتى وصل إلى حوالي 13 مم بتركيز 7%، ما يتوافق مع نتائج Daferera عام 2000، ونفس القراءات لوحظت على تثبيط نمو خميرة *Candida albicans* والتي تتوافق مع نتائج Sacchetti وزملاؤه عام 2005، كما أظهر زيت الزعتر العطري تأثيراً مثبطاً لنمو خميرة *Rhodotorula glutins* حيث كان التأثير المثبط بتركيز منخفض، وبلغ قطر التثبيط حوالي 11.5 مم بتركيز 7% وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج Sacchetti وزملاؤه عام 2005.

الجدول (22) متوسطات أقطار الصد لزيت إكليل الجبل على الفطور والخمائر المدروسة (مم)*

التركيز	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Rhodotorula glutins</i>
1%	0	4.1±0.22	0	0
2%	0	4.5±0.22	0	0
3%	0	5.1±0.22	0	0
4%	0	6.1±0.22	0	0
5%	0	7.2±0.27	6.0±0	0
6%	0	8.1±0.42	7.1±0.21	0
7%	0	11.2±0.45	8.2±0.43	0

*القراءات في الجدول هي متوسط لخمس مكررات

يبين الجدول السابق التأثير المثبط لزيت إكليل الجبل العطري، وكما هو واضح أن زيت إكليل الجبل العطري يملك تأثيراً مثبطاً أضعف من التأثير المثبط لزيت الزعتر العطري في تثبيط نمو الفطور والخمائر المدروسة، والنتائج المذكورة في الجدول منها ما توافق مع بعض الدراسات المرجعية والبعض الآخر خالفها.

لم يظهر زيت إكليل الجبل أي تأثير مثبط لنمو فطر *Penicillium digitatum* بجميع التراكيز المستخدمة وهو موافق لنتائج دراسة مشابهة أجراها Daferara وزملاؤه عام 2000، ولم يظهر أي تأثير مثبط أيضاً لنمو خميرة *Rhodotorula glutins* وكانت هذه النتيجة مخالفة لما ورد في نتائج أبحاث دراسة التأثير المثبط لزيت إكليل الجبل العطري في الخميرة المذكورة، ويعود السبب غالباً لمكونات الزيت العطري ونسب وجودها في الزيت، بالمقابل أظهر زيت

إكليل الجبل العطري تأثيراً مثبطاً في نمو فطر الـ *Fusarium sp* حيث أظهر تأثيراً مثبطاً لنموه بتركيز 1% بقطر تثبيط حوالي 4 مم وتزايد بشكل تدريجي ليبلغ 11.2 مم وهو يتوافق مع الأبحاث الأخرى من حيث امتلاك تأثير مثبط كدراسة Daferera وزملاؤه عام 2003، ولكنها تختلف معها في أن قوة التأثير المثبط لزيت إكليل الجبل العطري كانت أقل منها المسجلة في الدراسات الأخرى وهذا يعود لعدة عوامل بيئية ووراثية تساهم في تغيير مكونات الزيت العطري ونسب وجودها وبالتالي قدرة المكونات العطرية على النفوذ من جدران الخلية وبالتالي تثبيط نموها، والحالة نفسها لوحظت مع خميرة *Candida albicans* حيث لم يسجل أي تأثير مثبط إلا بتركيز 5% حيث بلغ قطر التثبيط 6 مم وتزايد ليصل حوالي 8 مم بتركيز 7%، وهذا يعارض الدراسات التي بينت أن زيت إكليل الجبل العطري قادر على تثبيط نمو الخميرة المذكورة بتركيز منخفضة نسبياً، والسبب يعود لمكونات الزيت ونسبها التي تتأثر بالعوامل البيئية ومصدر النبات وقدرتها على النفوذ من جدار الخلية.

يمتلك زيت الزعتر العطري تأثيراً مثبطاً لنمو الفطور والخمائر أقوى منه في زيت إكليل الجبل العطري، وهذا يتفق مع الأبحاث المشابهة الأخرى، وهذا يعود بشكل أساسي لاختلاف مكونات الزيتين المضادة لنمو الأحياء الدقيقة بشكل كبير من حيث النوع والنسبة. أظهرت الفطور والخمائر المدروسة مقاومة أقل من البكتيريا الممرضة المدروسة للتأثير المثبط لزيت الزعتر العطري، وهذا يتفق مع توصل إليه Nikaido عام 1996 و Smith وزملاؤه عام 1998، بينما الفطور والخمائر أظهرت مقاومة لزيت إكليل الجبل العطري مقارنة بالبكتيريا عدا الجنس *Fusarium* أظهر مقاومة منخفضة لزيت إكليل الجبل.

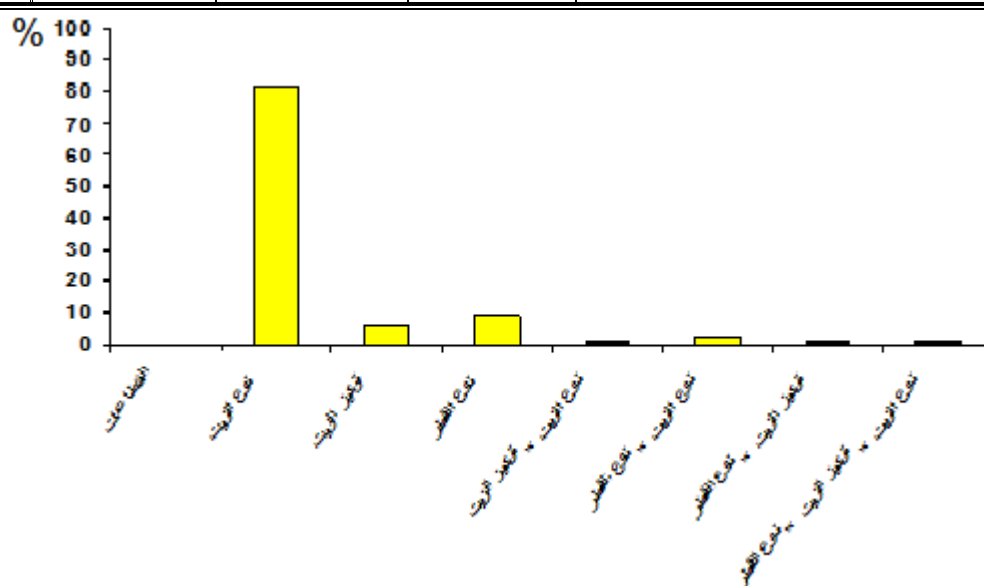
1-2-2-5 - تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط نمو الفطور

والخمائر:

أجري التحليل الإحصائي لنتائج أقطار التثبيط للتركيز المدروسة لزيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين، لمعرفة مدى تأثير كل من المتغيرات نوع الزيت، تركيز الزيت المستخدم، نوع الفطر أو الخميرة، والتأثير المتداخل لها في قطر التثبيط المتحصل عليه كنتيجة ظاهرية للتأثير المثبط لنمو الأحياء الدقيقة المختلفة، ويوضح كل من الجدول (23) والشكل (8) تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر التثبيط.

الجدول (23) يوضح تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط الفطور والخمائر

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
القطاعات	4	0.166	0.01	0.017
نوع الزيت	1	2541.044	81.43	0
تركيز الزيت	6	193.233	6.19	0
نوع الفطر والخميرة	3	276.672	8.87	0
نوع الزيت × تركيز الزيت	6	15.504	0.50	0
نوع الزيت × نوع الفطر والخميرة	3	60.732	1.95	0
تركيز الزيت × نوع الفطر والخميرة	18	13.719	0.44	0
نوع الزيت × تركيز الزيت × نوع الفطر والخميرة	18	19.462	0.62	0

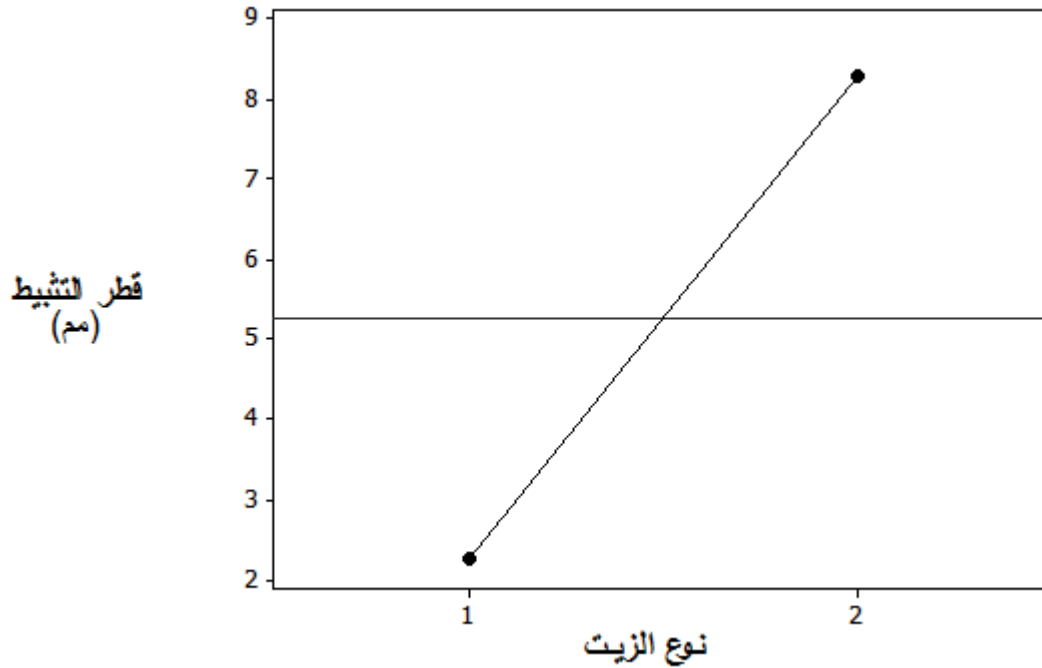


الشكل (8) يوضح تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في قطر تثبيط الفطور والخمائر

نلاحظ وجود فروق معنوية بين جميع مستويات المتغيرات المدروسة، يتبين من الجدول والشكل السابقين أن أكثر من 80% من التباين في أقطار التثبيط المتحصل عليها كان ناتجاً عن تأثير نوع الزيت، وساهم متغير نوع الفطر أو الخميرة بحوالي 9%، وهذا يعود إلى تشابه سلوك الجدار الخلوي للفطور والخمائر المدروسة اتجاه المضادات الميكروبية والزيوت العطرية.

5-2-2-2- تأثير نوع الزيت في قطر تثبيط الفطور والخمائر:

أجريت دراسة إحصائية لتحديد الفروق المعنوية بين نوعي الزيت المستخدمين في الدراسة من حيث تأثيرهما التثبيطي، ويبين الشكل (9) مقارنة بين زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطري من حيث القدرة على تثبيط الفطور والخمائر المدروسة.



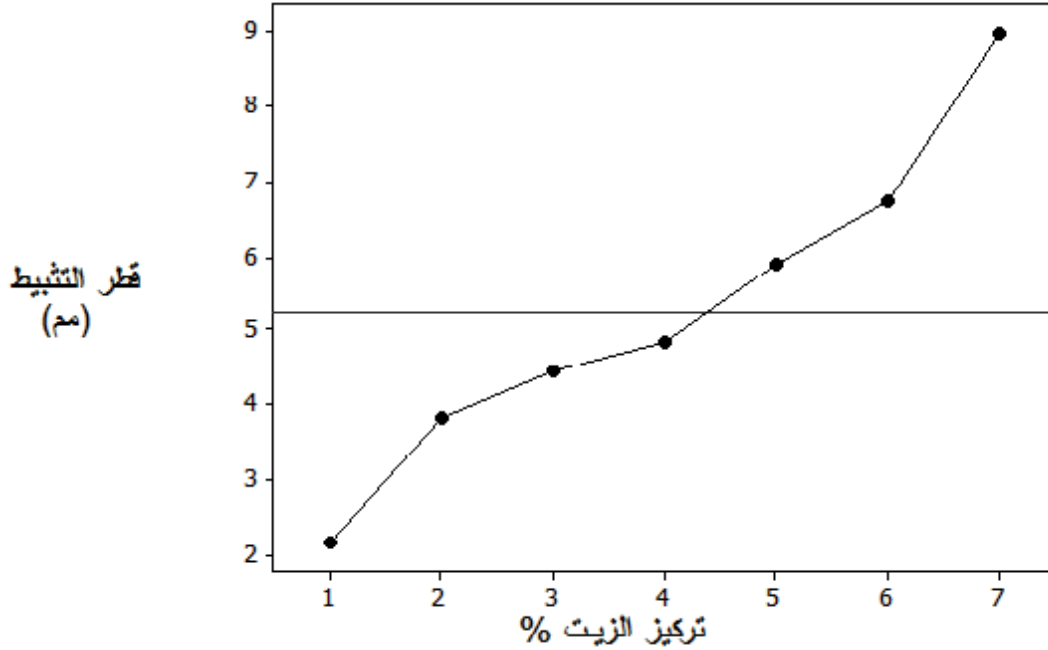
الشكل (9) يبين تأثير نوع الزيت في تثبيط الفطور والخمائر.

حيث: 1- إكليل الجبل، 2- زيت الزعتر

أشار التحليل الإحصائي لوجود فروق معنوية بين نوعي الزيتين، كما يبين الشكل السابق أن القدرة التثبيطية لزيت الزعتر العطري كانت أعلى منها في زيت إكليل الجبل العطري، وهذا يعود لاختلاف مكونات كل من الزيتين حيث يعتبر مركب الكارفاكرول مضاد ميكروبي قوي مقارنة بالـ α -pinene والـ 1.8-Cineole والـ Borneol ، بالإضافة إلى ذلك بلغت نسبة المركبات العطرية المضادة لنمو الأحياء الدقيقة 90% في زيت الزعتر العطري شكل الكارفاكرول 80% منها، بينما بلغت 40% فقط في زيت إكليل الجبل العطري.

3-2-2-5- تأثير تركيز الزيت في قطر تثبيط الفطور والخمائر:

أجري التحليل الإحصائي لتحديد الفروق المعنوية بين التراكيز المستخدمة، ويبين الشكل (10) تأثير تركيز الزيت في قطر تثبيط أنواع الفطور والخمائر المدروسة.

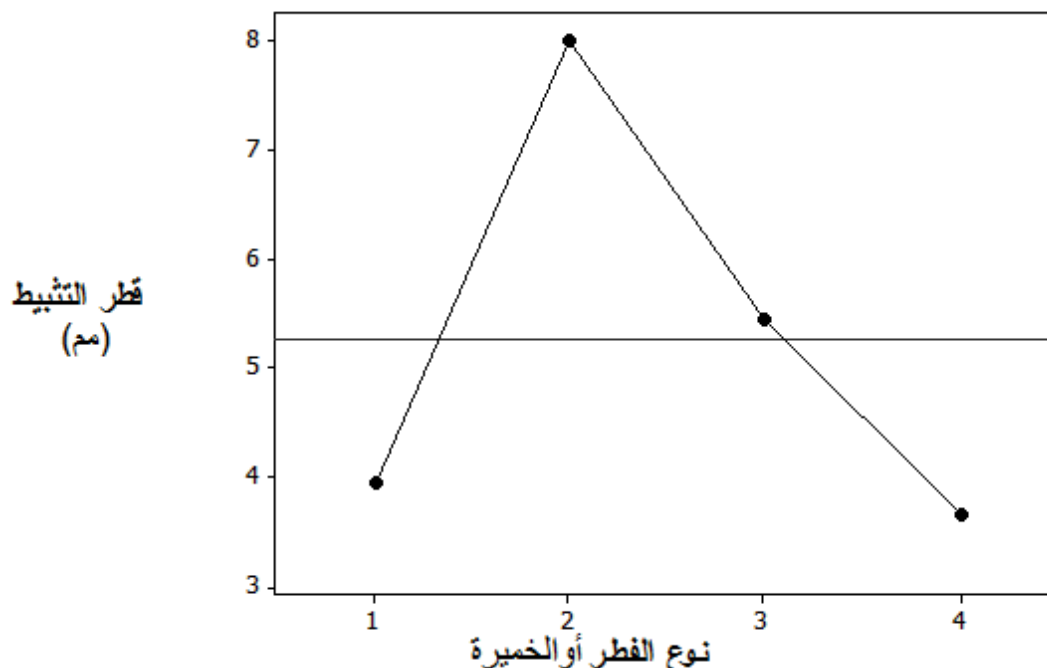


الشكل (10) يبين تأثير تركيز الزيت في قطر التثبيط للأنواع البكتيرية المدروسة.

أظهرت الدراسة الإحصائية فروقاً معنوية بين التراكيز المستخدمة من زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين، ويبين الشكل السابق وجود علاقة طردية بين قطر التثبيط و تركيز الزيت المستخدم.

4-2-2-5- تأثير نوع الفطر والخميرة في قطر تثبيطها:

أجري التحليل الإحصائي لتحديد الفروق المعنوية بين أنواع الفطور والخمائر المدروسة وأتبع باختيار Tukey لتحديد الفروق المعنوية بين المستويات، يبين الشكل (11) تأثير عامل نوع الفطر أو الخميرة المدروسة في قطر التثبيط المتكون (مم).



الشكل (11) يبين تأثير نوع الفطر في قطر تثبيط نمو الفطور والخمائر. حيث: (1) *Penicillium digitatum* (2) *Fusarium sp* (3) *Candida albicans* (4) *Rhodotorula glutins*

بينت التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين مقاومة أنواع الفطور والخمائر المختلفة، حيث يبين الشكل السابق أن فطر *Penicillium digitatum* كانت أكثر مقاومة من فطر *Fusarium sp* الذي أظهر أقل مقاومة للتأثير المثبط للزيوت العطرية، وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث Daferera وزملاؤه في بحثيه عام 2000 و 2003، ويعود ذلك لطبيعة الجدار المحيط بخلايا هذه الفطور والخمائر ومكونات الزيت العطري ونسبها، كما أظهرت خميرة الـ *Rhodotorula glutins* مقاومة عالية حيث أنها لم تتأثر بزيوت إكليل الجبل العطري.

3-5- نتائج دراسة تأثير الزيوت العطرية في فترة حفظ اللحم المبرد:

تمت معاملة اللحم المبرد بزيوتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين، وذلك لدراسة تأثير تركيزي 3% و 5% لزيوتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين في فترة حفظ اللحوم المبردة، وذلك من خلال مؤشرين هما التعداد الكلي وتعداد الفطور والخمائر، حيث تم مراقبتها لمدة 12 يوماً ومقارنتها مع عينات الشاهد.

5-3-1- نتائج دراسة تأثير الزيوت العطرية في التعداد الكلي للحم المبرد:

يبين الجدول (21) تأثير زيتي الزعتر وإكليل الجبل في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة ومقارنتها مع الشاهد ومدى مطابقة التعداد العام للمواصفة القياسية السورية رقم 2179-2007.

الجدول (24) متوسطات العد الكلي لعينات اللحم المعامل بالزيت والشاهد*

الايام	زعتر 3%	زعتر 5%	اكيل جبل 3%	اكيل جبل 5%	الشاهد
الرابع	6×10^4	8×10^4	2.52×10^5	1.8×10^4	9×10^7
الخامس	2.26×10^5	1×10^4	6.2×10^5	7.4×10^4	6.5×10^9
السادس	3×10^5	1.22×10^5	9.2×10^5	1.2×10^5	1.3×10^{10}
السابع	4.8×10^5	1.5×10^5	1.02×10^6	1.26×10^5	8.2×10^{11}
الثامن	1.06×10^6	1.9×10^5	5.63×10^6	1.8×10^5	-
التاسع	3.24×10^6	2.5×10^5	9.64×10^6	2.5×10^5	-
العاشر	7.80×10^6	8.1×10^5	1.3×10^7	1.2×10^6	-
الحادي عشر	1.54×10^7	1.04×10^6	3×10^7	1.6×10^7	-
الثاني عشر	3.56×10^7	4.85×10^6	5.6×10^7	2.6×10^7	-

*القيم في الجدول تمثل حاصل المتوسط لخمس مكررات

*القيم في الجدول مضروبة بـ 10^6

يبين الجدول السابق التعداد الكلي لعينات اللحم المبرد المعاملة بتركيزي 3% و 5% من زيتي الزعتر وإكليل الجبل ومقارنتها مع عينات الشاهد، أظهرت النتائج في الجدول السابق أن الزيوت العطرية قادرة على إطالة فترة حفظ اللحم المبرد لفترات متفاوتة متأثرة بعدة عوامل، حيث أنها حافظت على التعداد العام للأحياء الدقيقة أقل من 10×10^6 خلية لفترات متفاوتة حسب نوع الزيت وتركيزه، يوضح الجدول السابق أن زيت الزعتر العطري يملك تأثيراً واضحاً لزيادة فترة حفظ اللحم المبرد مقارنة بعينات الشاهد التي تعرضت للفساد الواضح بمؤشر التعداد العام الذي بلغ 10×9 خلية من اليوم الرابع للحفظ، وظهرت علامات الفساد الحسية من اليوم الخامس، حيث كان هناك تلون أخضر لسطح اللحم ناتج عن نمو الأحياء الدقيقة وظهور رائحة واخزة واضحة ناتجة عن تحلل مكونات اللحم نتيجة النشاط الميكروبي ونشاط أنزيمات اللحم الطبيعية، بلغت فترة حفظ اللحم المبرد لـ 11 يوماً عند استخدامه بتركيز 5% و 8 أيام عند استخدام تركيز 3%، وهذا يتوافق مع Ouattara وزملاؤه عام 2001، ومع نتائج

Leuschner و Ielsch عام 2003، حيث أن المواصفة القياسية السورية تنص على عدم تجاوز التعداد العام 10×10^6 خلية.

تبين أن زيت إكليل الجبل بتركيزي 5% و 3% قادرين على إطالة فترة حفظ اللحم المبرد حتى 10 أيام و 7 أيام على التوالي، وهذا يتوافق مع نتائج Pandit و Shelef عام 1994، ونتائج Djenane وزملاؤه عام 2003 حيث بلغت فترة حفظ لحم البقر المبرد حتى 20 يوماً.

يلاحظ من الجدول السابق أن قدرة الزيتين العطريين الحفظية للحم المبرد اختلفت متأثرة بعدة عوامل هي نوع الزيت، وتركيزه، فقد كان زيت الزعتر العطري يملك تأثيراً مثبطاً لنمو الأحياء الدقيقة أعلى بقليل من زيت إكليل الجبل العطري، وهذا يتوافق مع نتائج دراسة التأثير المثبط لهما في نمو البكتيريا والفطور والخمائر السابقة الذكر.

5-3-1-1- تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة:

أجري التحليل الإحصائي لنتائج التعداد الكلي للحم المبرد المعامل بزيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين بتركيزي 3% و 5%، لمعرفة مدى تأثير كل من المتغيرات نوع الزيت، تركيز الزيت المستخدم، فترة التخزين والتفاعل المتبادل بينهم في التعداد العام المتحصل عليه كنتيجة ظاهرية للتأثير الحفظي للحم المبرد، ويوضح الجدول (25) تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة.

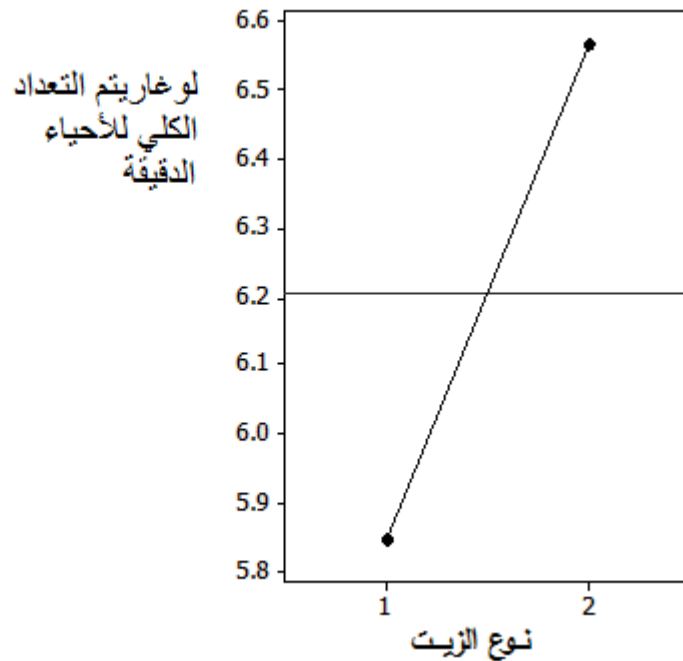
الجدول (25) يوضح تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة.

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
القطاعات	4	0.0166	0.02	0.503
نوع الزيت	1	23.2632	24.98	0
تركيز الزيت	1	44.7503	48.04	0
فترة التخزين	8	18.3621	19.71	0
نوع الزيت × تركيز الزيت	1	5.481	5.88	0
نوع الزيت × فترة التخزين	8	0.2936	0.32	0
تركيز الزيت × فترة التخزين	8	0.7037	0.76	0
نوع الزيت × تركيز الزيت × فترة التخزين	8	0.2546	0.27	0

يبين الجدول السابق أن أكثر من 70% من التباين في التعداد الكلي ناتج عن متغيري نوع الزيت وتركيزه، كما يبين وجود فروق معنوية بشكل عام بين نوعي الزيت والتراكيز المستخدمة وفترات التخزين.

5-3-1-2- تأثير نوع الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة:

أجري التحليل الإحصائي لدراسة وجود فروق معنوية في قيم التعداد الكلي المتحصل عليه نتيجة استخدام زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين، ويوضح الشكل (12) تأثير نوع الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة.



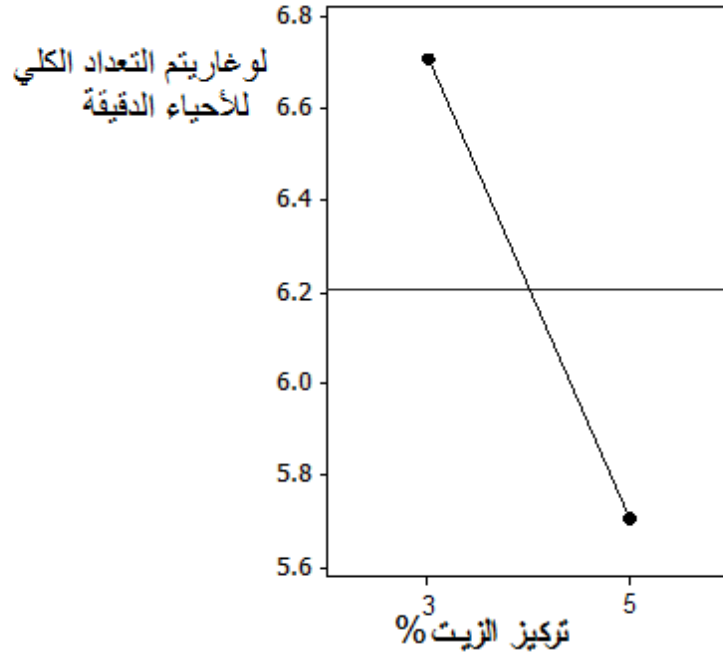
الشكل (12) يبين تأثير نوع الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة.

حيث: 1- زيت الزعتر، 2- إكليل الجبل

بين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين تأثير كل من زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين في التعداد الكلي، حيث تبين أن زيت الزعتر العطري يملك قدرة أعلى نسبياً من زيت إكليل الجبل العطري على تثبيط نمو الفلورا الطبيعية المتواجدة في اللحم الطازج والمسببة لفسادها، وبالتالي فإن زيت الزعتر العطري قادر على إطالة فترة حفظ اللحم المبرد بشكل أكبر من زيت إكليل الجبل العطري، وهذا يتوافق مع نتائج تقدير قطر التثبيط للبكتيريا الممرضة والفطور والخمائر.

3-1-3-5- تأثير تركيز الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة:

أجري التحليل الإحصائي لدراسة وجود فروق معنوية في قيم التعداد الكلي المتحصل عليه نتيجة استخدام تركيزي 3% و 5% من زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين، ويبين الشكل (11) تأثير تركيز الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة.

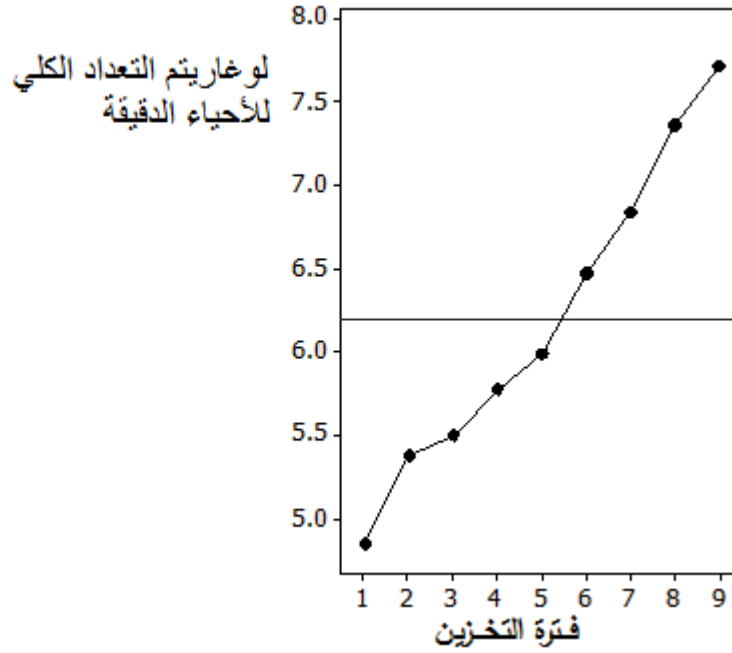


الشكل (13) يبين تأثير تركيز الزيت في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة.

تبين بالتحليل الإحصائي لنتائج التعداد الكلي المتحصل عليها باستخدام تركيزين من زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين وجود فروق معنوية بين تركيزي 3% و 5% المستخدمين لحفظ اللحم المبرد، حيث تبين أن التركيز 5% هو أكثر قدرة على إطالة فترة حفظ اللحم المبرد من التركيز 3%، حيث وصلت فترة حفظ اللحم المبرد حتى 11 يوماً عند استخدام التركيز 5% لكل من الزيتين المستخدمين في الدراسة.

3-1-3-5- تأثير فترة التخزين في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة:

أجري التحليل الإحصائي لدراسة وجود فروق معنوية في قيم التعداد الكلي المتحصل عليه خلال فترة التخزين التي بلغت 12 يوماً، ويبين الشكل (14) تأثير فترة التخزين في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة.



الشكل (14) يبين تأثير فترة التخزين في التعداد الكلي للأحياء الدقيقة. حيث: (1) اليوم الرابع (2) اليوم الخامس (3) اليوم السادس (4) اليوم السابع (5) اليوم الثامن (6) اليوم التاسع (7) اليوم العاشر (8) اليوم الحادي عشر (9) اليوم الثاني عشر

أشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى عدم وجود فروق معنوية بين الأيام الرابع، الخامس، السادس، السابع والثامن من التخزين، وهذا ما يفسر قدرة الزيتين العطرين على حفظ اللحم المبرد لمدة كان أقصاها 11 يوماً عند استخدام تركيز 5% من زيت الزعتر العطري، وأدناها 7 أيام عند استخدام زيت إكليل الجبل بتركيز 3%.

6- الاستنتاجات:

- 1- يتكون زيت الزعتر العطري المحلي من 11 مركب عطري، حيث شكل كل من مركبي الكارفاكروول والثايمول 73% و8% على التوالي.
- 2- يتكون زيت إكليل الجبل العطري من 49 مركباً أهمها: α -pinene (12.25%)، Camphor (12.29%)، 1.8-Cineole (10.75%) و Borneol (8.89%).
- 3- تفوق زيت الزعتر العطري على زيت إكليل الجبل بتأثيره المثبط لنمو الأحياء الدقيقة المدروسة، حيث شكلت نسبة المركبات العطرية المثبطة في الزعتر المحلي ضعفها في إكليل الجبل المحلي.
- 4- أظهرت البكتيريا موجبة الغرام حساسية أعلى لتأثير زيت الزعتر العطري من البكتيريا سالبة الغرام، بينما أظهرت البكتيريا سالبة الغرام تدرجاً في حساسيتها لزيت إكليل الجبل العطري.
- 5- أظهرت الفطريات مقاومة أقل من البكتيريا لتأثير زيت الزعتر العطري، حيث أظهر فطر *Fusarium* أقل مقاومة بين أنواع الفطور والخمائر المدروسة.
- 6- أظهرت الفطريات مقاومة أعلى من البكتيريا لزيت إكليل الجبل العطري، حيث أظهر فطر *Penicillium* وخميرة *Rhodotorula* المقاومة الأعلى لزيت إكليل الجبل، في حين كان فطر *Fusarium* أقلها مقاومة.
- 7- إمكانية إطالة فترة حفظ اللحم المبرد المقطع، حيث بلغت 11 يوماً و10 أيام عند إضافة زيتي الزعتر وإكليل الجبل العطريين على التوالي، في حين لا تتجاوز فترة حفظ اللحم المبرد 3-4 أيام.

7- المقترحات:

- 1- التوسع في دراسة التأثير المثبط لمزيد من النباتات العطرية المحلية.
- 2- فصل مكونات الزيوت العطرية، ودراسة تأثيرها المثبط بشكل منفصل.
- 3- دراسة إمكانية تصنيع بعض المركبات العطرية المثبطة بشكل تجاري، بهدف دراسة تأثيراتها الصحية واستخدامها كمواد حافظة.
- 4- تحميل الزيوت العطرية في مختلف منتجات اللحوم ومشتقاتها، بحيث يمكن الحصول على منتجات بنكهات متنوعة تلقى استحسان المستهلك.
- 5- دراسة تأثير المعاملة بالزيوت العطرية في الصفات الحسية للحوم ومنتجاتها.
- 6- دراسة إمكانية استبدال المواد الحافظة الكيميائية ببعض الزيوت العطرية.

8- المراجع الأجنبية:

- Abu-Darwish, M., and Abu-Dieyeh, Z., (2009) Essential Oil Content and Heavy Metals Composition of *Thymus vulgaris* Cultivated in Various Climatic Regions of Jordan. *International Journal of agriculture & biology*.11–1–59–63
- Andersson, A., Ronner, U., Granum, P.E., (1995) What problems does the industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*, *Int J Food Microbial*. 28 (2): 145- 155.
- AOAC, (2000) official methods of analysis of AOAC international, 17th edition. USA.
- Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, S. Nangia, and J. H. Rex. 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol*. 37:3946-3951.
- Aureli, P., Costantini, A., Zolea, S., (1992) Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55 (5), 344–348.
- Barbara, H. I., (1996). *Medical Microbiology*. 4th edition. London: Blackie. 152-155.
- Beers, M.H., Berkow, R., (2002) Bacterial infections caused by Gram-negative bacilli. *Enterobacteriaceae*. In *Merck Manual*, 17th ed, Edited by, Whitehouse station, NJ: Merck and Co.
- Bertelli, D., Plessi, M., Miglietta, F., (2003) Effect of microwaves on volatile compounds in *origanum*, *U-Technol*. 36: 555-560.
- Betty, D., and Giibert, A., (1980) Food Poisoning and Food Hygiene, *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. 100, 3, 104-110.
- Brent, K.J., Hollomon, D.W., (1998) Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC, Global Crop Protection Federation, Brussels, Monograph, 2, 1–48.

- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., (2003) Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85(3), 415–421.
- Burt S., (2004) Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
- Campo, J., Amiot, M., Nguyen, C., (2000) Antimicrobial Effect of Rosemary Extracts. *Journal of Food Protection*. 63 (10), 1359-1368.
- Celikel, N & Kavas, G., (2008) Antimicrobial Properties of Some Essential Oils Against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech J. Food Sci*, 26, (3) 174 – 181.
- Chebli, B., Mohamed, A., Idrissi, H., Hmamouchi, M., (2003) Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology* 89 : 165–169.
- Coburn J, Wyatt RT, Iglewski BH, Gill DM.(1989). Several GTP-binding proteins, including o24 C-H-ras, are preferred substrates of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J Biol Chem*;264-277.
- Conner, D.E., (1993) Naturally occurring compounds. In P.M.Davidson, & A.L.Branen (Eds), *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Darker. 441-468
- Conner, D.E., Beuchat, L.R., (1984) Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science* 49, 429–434.
- Corlet A., Staier R. (1990).. FDA, USA.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., (1999) In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130– 135.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., (2000). Mode of antimicrobial action

of essential oil of *Melaleuca alternifolia* tea tree oil .J. Appl. Microbiol. 88,170–175.

Crissy, T. J., Lang, H., Parish, C.L., (1995) Manual of Medical Mycology by Blackwell Sciences, Cambridge, Massachusettes,. 263.

Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., (2000) GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 2576–2581.

Daferera, D.J., Ziogas, N.B., Polissiou, G.M., (2003) The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection. 22: 39–44.

Davidson P.M. (2001): Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds. In: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (eds): Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 2nd Ed. ASM Press, Washington: 593–628.

Davidson, P.M., (1997) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM, Washington, 520–556.

Deans, S.G., & Ritchi, G.A., (1987) Antimicrobial properties of plant essential oils. International Journal of food Microbiology, 5,165-180.

Deans, S.G., Noble, R.C., Hiltunen, R., Wuryani, W., Penzes, L.G.(1995)Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. Flavour and Fragrance Journal, 10, 323-328.

Dehoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J., (2000) Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology 74, 101–109.

- Devincenzia, M., Stamatib, A., Devincenzia, A., Silanoa, M., (2004) Safety data review constituents of aromatic plants: Carvacrol Fitoterapia, Italy, 75: 801-804.
- Djenane, D., Armida, S., Jose, A.B., Pedro, R., (2003) Extension of the shelf life of beef steaks packaged in a modified atmosphere by treatment with rosemary and displayed under UV-free lighting. Meat Science 64, 417–426.
- Dorman, H.J.D & Deans, S.G, (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88, 2, 308–316.
- Dunn M, Wunderink RG. (1995) Ventilator-associated pneumonia caused by Pseudomonas infection. (Review) Clinics of Chest Medicine. (16):95.
- Friedman, M., Henika, R.P., Mandrell, E.R., (2002) Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enteric. Journal of Food Protection. 65 (10): 1545–1560.
- Genana K.A., Hense H., Junior S.A., Souza M.S., (2008) Rosemary (Rosemarinus officinalis) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(2): 463-469.
- Grigore, A., Ina paraschiv, Colceru-mihul, S., Bubueanu, C., Draghici, E., Ichim, M., (2010) Chemical composition and antioxidant activity of Thymus vulgaris L. volatile oil obtained by two different methods. Romanian Biotechnological Letters. 15 (4): 240-247.
- Gumnicuvcka, O., Oleszek, W., 1998, Triterpen saponins from the aerial parts of Dianthus caryophyllus var remontant hort, J. Acta societatis botanicorum poloniae, 26, 356-365
- Hao, Y.Y., Brackett, R.E., Doyle, M.P., (1998) Inhibition of Listeria monocytogenes and Aeromonas hydrophila by plant extracts in refrigerated cooked beef. Journal of Food Protection 61 (3), 307–312.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A., (2003) Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian

sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection* 66 (3), 410–417.

Helander, I.K., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J. and von Wright, A., (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agricultural Chemistry*. 46, 3590-3595.

Heravi, J.M., Moazeni, S.D., Sereshti, H., (2011) Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography A*. 1218 : 2569–2576.

Jiang Y., Wu N., Fu Y., Wang W., Luo M., Zhao C., Zu Y., Liu X., (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *environmental toxicology and pharmacology journal*. 23,129-134.

Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., (2000) Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12, 516–522.

Juven, B.J., Kamnner, J., Schved, F., Weissiowicz, H., (1994) Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626–631.

Kabara, J.J., (1991) Phenols and chelators. In *Food Preservatives*, eds Russell, N.J. and Gould, G.W. London: Blackie. 200-214.

Karanika, M.S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2001) Effect of aqueous extracts of some plants of Lamiaceae family on the growth of *Yarrowia Lipolytica*, *International Journal of Food Microbiology*, 64 (1-2): 175-181.

Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C.I., (1995) Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2839–2845.

Kisko G., Roller S., (2005) Carvacrol and P-cymene inactive *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, *BMC Microbiology*, 5:36.

- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T., 1997, Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* 44 (5), 883–886.
- Kotzekidon, P. Giannakidis, P., Boulamatsis, A., (2008) Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate, *LWT* 41, 119–127
- Krajčová, E., Greifová, M., Schmidt, S., (2008) Study of antimicrobial activity of selected plant extracts against bacterial food contaminants. *Journal of Food and Nutrition Research* 47 (3) 125–130.
- Kunle O., Okogun J., Egamanal E., Shok M., Emojevwe E., (2003) Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract, *Antimicrobial acti Phytomedicine*, 10: 59-61.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.-J.E., (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453–462.
- Leuschner R.G., Ielsch V., (2003) Antimicrobial effects of garlic, thyme, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in broth model systems and soft cheese. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 54: 127-133.
- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I., (2009) Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry* 112, 77–83.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G., (1999) Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* 62 (9), 1017–1023.
- Mathews, S.R., Singhal, S., Kulkarni, P.R., (1990) Chemical indices of food decomposition, *Trends Food Sci. Technol.* 1, 89-91.
- Mejlholm, O., Dalgaard, P., (2002) Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum*

in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* 34, 27– 31.

Menon V.K., Garg S.R. (2001): Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiology*, 18: 647–650.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 5th edn. Wayne: Approved Standard.

Nikaido, H. and Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1 – 32.

Nikaido, H., (1996) Outer membrane. In: F.C. Neidhardt, (Ed), *Escherichia coli and salmonella: Cellular and molecular biology*. 1, 29-47.

Olasupo, N.A., Fitzgerald, D.J., Gasson, M.J., Narbad,A., (2003) Activity of antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* serovar typhimurium, *Letters in Applied Microbiology*, 36, 448-451.

Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z., Naghdibadi H. (2007) Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518–1523.

Ouattara, B., Sabato, S.F., Lacroix, M., (2001) Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). *International Journal of Food Microbiology* 68, 1– 9.

Pandit, V.A., Shelef, L.A., (1994) Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology* 11, 57– 63.

Pattnait, S., (1997) antimicrobial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *J. Microbios*, 89: 39-46.

Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R. (1988) Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. In: *Microbiology*, pp. 469-509. New York: McGraw-Hill International.

Pitt, J. I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., and Tanboon-Ek, P., (1994) The normal mycoflora of commodities

from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. International Journal of Food Microbiology. 23:35-43.

Pol, I.E., Smid, E.J., (1999) Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology 29, 166– 170.

Postgate, J., (1998). Nitrogen fixation, 3rd ed.. Cambridge University Press, 190-194.

Postgate, J., (1994) "The Outer Reaches of Life", Cambridge University Press, 132-134.

Pritchard AE, Vasal ML. (1990) Possible insertion sequences in a mosaic genome organization upstream of the exotoxin A gene in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 172:2020.

Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J.M., Michel, G.M., Baccou, J.C., (1995) Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. Journal of Essential Oil Research 7, 165– 173.

Raaijmakers, A. & Orav. A. (2005). Comparative chemical composition of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. from different geographical sources. Herba polonica. 51, 289-298.

Rashid T, Ebringer A (2006). "Ankylosing spondylitis is linked to *Klebsiella*—the evidence (Epub ahead of print)". Clin Rheumatol 26 (6): 858–64

Roller, S., Seedhar, P. (2002). Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 °C and 8 °C. Letters in Applied Microbiology 35, 390– 394.

Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A., (1998) Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) *Wiersma*): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3741– 3746.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzolli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005) Comparative evaluation of 11 essential

oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91, 621–632.

Sagdic O., (2003) sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm-Wiss. Technol.* 36, 467-473.

Sara L., Latta J., (1999) *Food Poisoning and Foodborne Diseases*, Enslow Publishers, Inc. 261-268.

Sikkema, J., de Bont, J.A.M. and Poolman, B., (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews* 59, 201-222.

Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Stroshine, R.L., (2002) Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittelwissenschaften und Technologien* 35, 720– 729.

Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., (2001) Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1011 –1022.

Smith, P. A., Stewart, J., Fyfe, L., (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 118-122.

Smith, P. A., Stewart, J., Fyfe, L., (2001) The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology* 18, 463– 470.

Straus, D, C., (1987) "Production of an extracellular toxiccomplex by various strains of *Klebsiella pneumoniae*." *Infection ad Immunity*, American Society for Microbiology. 55 (1): 44-48.

The British Pharmaceutical codex. Published by direction of the council of the Pharmaceutical Society of Great Britain, (2007).

Ting, E.W.T, Deibel, K.E., (1992) Sensitivity of *Listeria Monocytogenes* to species at two temperatures, *J. Food Safety* 2(2): 2129-2137.

Tisserand, R.B., (1977) *The Art of Aromatherapy*. Healing Arts, Rochester, VT.

- Tournas, V.H., (2005) Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Crit Rev Microbiol* 31(1):33-44.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.J.E., (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 jC. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 901–909.
- Turkish Food Codex – Spice paper. Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Official Gazette, 31.07.2000.
- Ultee, A., Gorris, L.G.M., Smid, E.J., (1998) Bactericidal activity of carvacrol towards the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85, 2111–2218.
- Ultee, A., Smid, E.J., (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 64, 373–378.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Phytochemical and Entombotanical Databases. [Online Data] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. 01 October 2004.
- Valent J., 1986, *The Practice of Aromatherapy*, C.W.Daniel Co. Ltd. 143-144.
- Valero M. & Salmeron M.C., (2003) Antimicrobial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*. 85, Issues (1-2,15): 73 – 81.
- Volk, T.J., (1999) *Funges of the Mounth of January*, University of Wisconsin-La Crosse.
- Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M.J., (1998) The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology* 84, 152–158.

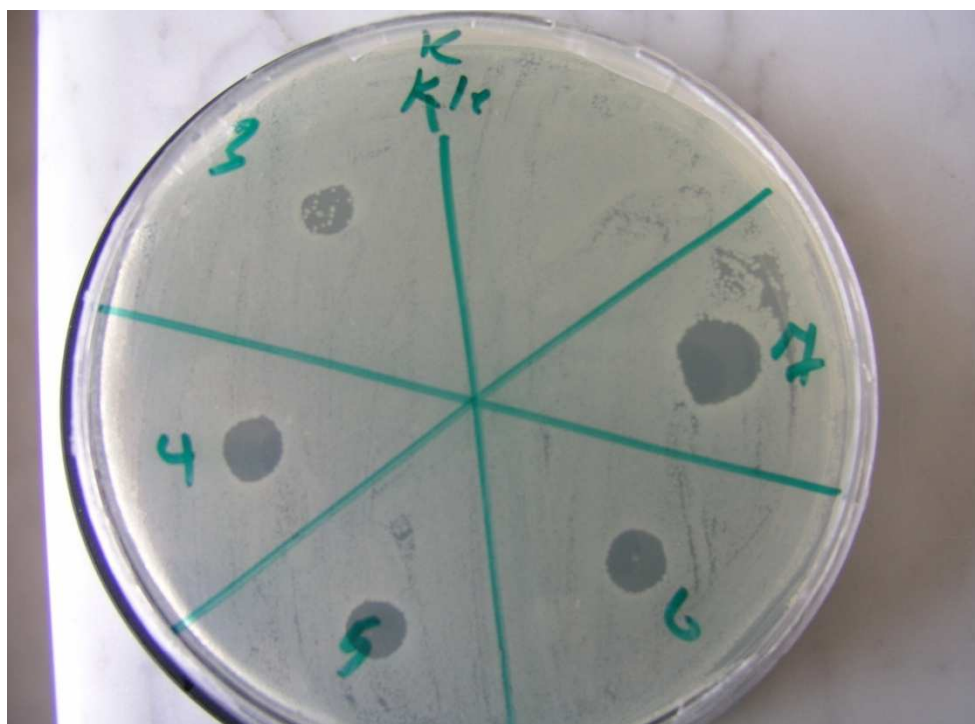
9- المراجع العربية:

- راشد، ناهد (2009) زراعة وإنتاج الزعتر. مركز البحوث الزراعية. معهد بحوث البساتين. قسم بحوث النباتات الطبية والعطرية. الصفحة 1-5.
- الصالح، رفيق (1998) دراسة مورفولوجية وكيميائية لنبات إكليل الجبل السوري. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. المجلد الرابع عشر. صفحة 98-110.
- طيفور، انطون وسفر، عادل (1990) ميكروبيولوجيا الأغذية والألبان. منشورات جامعة دمشق.
- المواصفة القياسية السورية رقم 2179 / 2007 الاشتراطات الخاصة بالأحياء الدقيقة الواجب تحقيقها في المنتجات الغذائية – المراجعة الثانية -

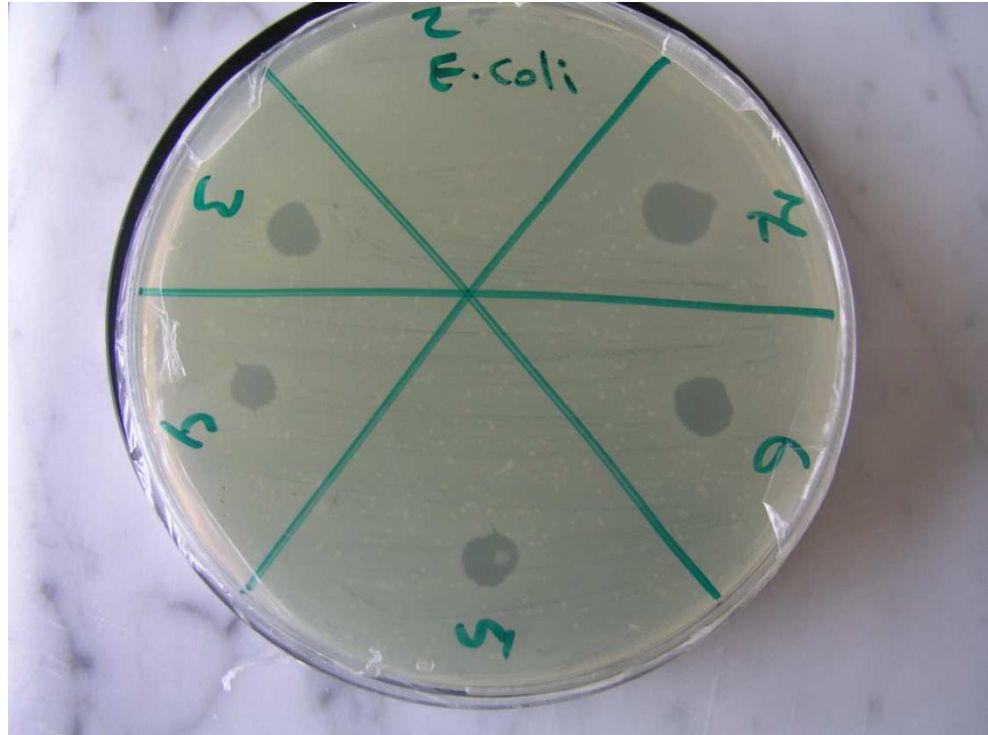
10- ملحق الصور:



الصورة (1) تبين تأثير زيت الزعتر العطري في بكتيريا *Klebsiella* باستخدام التراكيز 3-7%
%



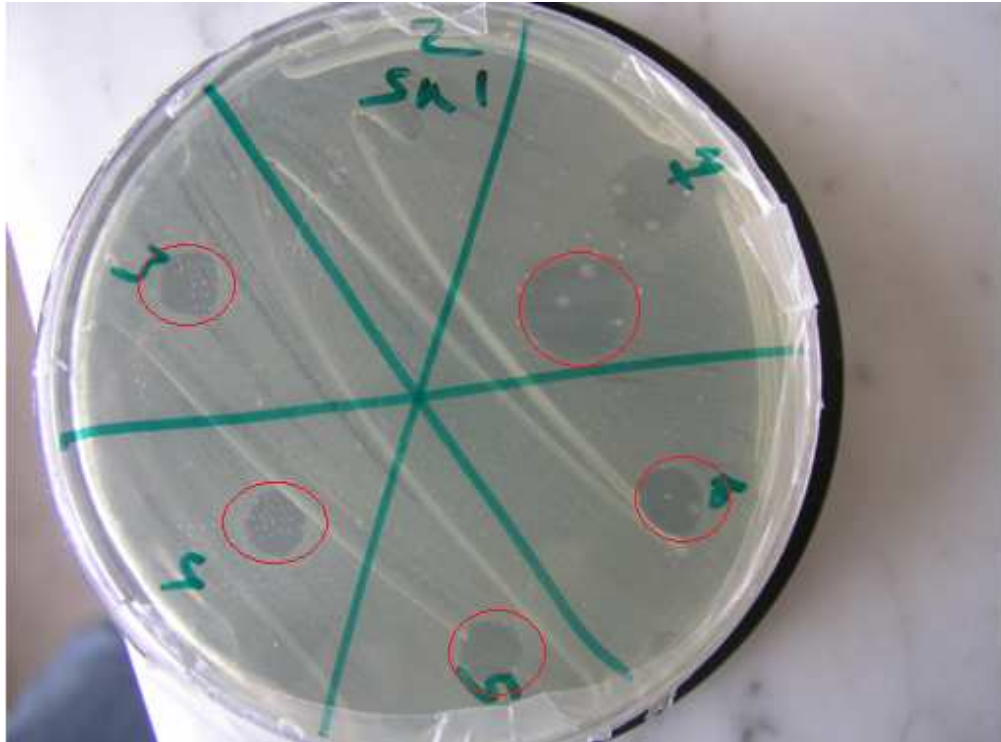
الصورة (2) تأثير زيت إكليل الجبل العطري في بكتيريا *Klebsiella* باستخدام التراكيز 3-7%
%



الصورة (3) تبين تأثير زيت الزعتر العطري في بكتيريا *E.coli* باستخدام التراكيز 3-7%



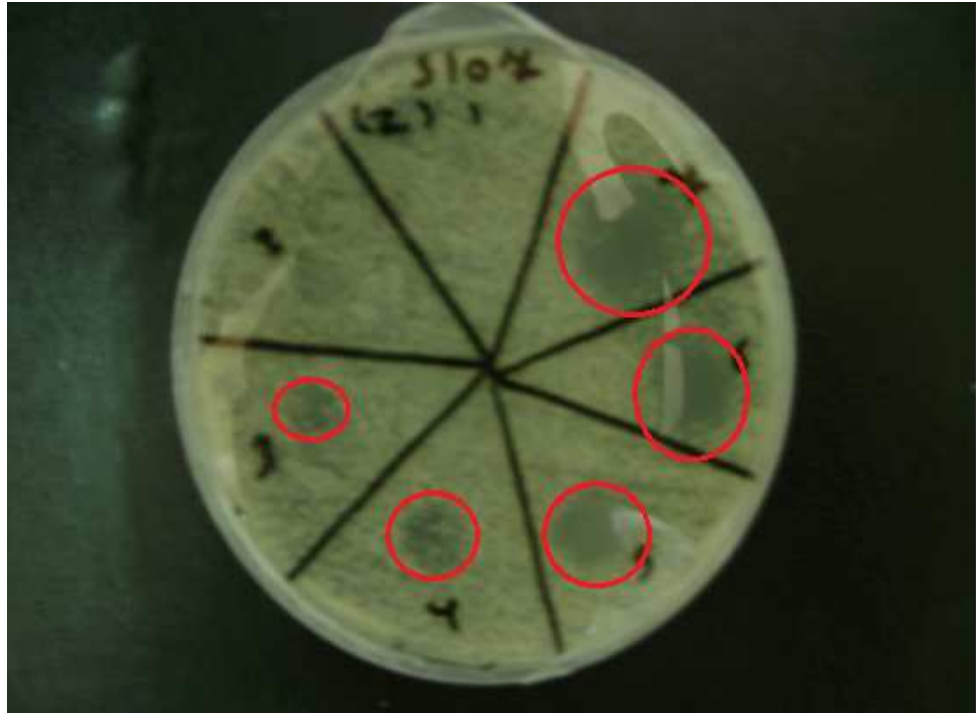
الصورة (4) تبين تأثير زيت إكليل الجبل العطري في بكتيريا *E.coli* باستخدام التراكيز 3-7%



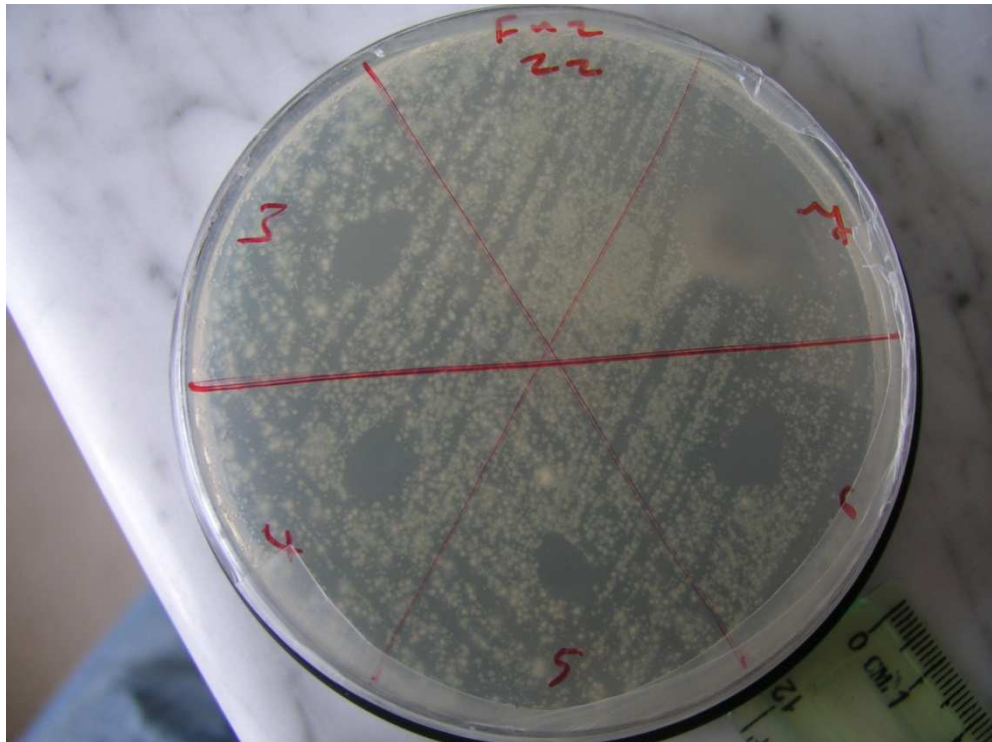
الصورة (5) تبين تأثير زيت الزعتر في بكتيريا *Salmonella* باستخدام التراكيز 3-7%



الصورة (6) تبين تأثير زيت إكليل الجبل في بكتيريا *Salmonella* باستخدام التراكيز 3-7%



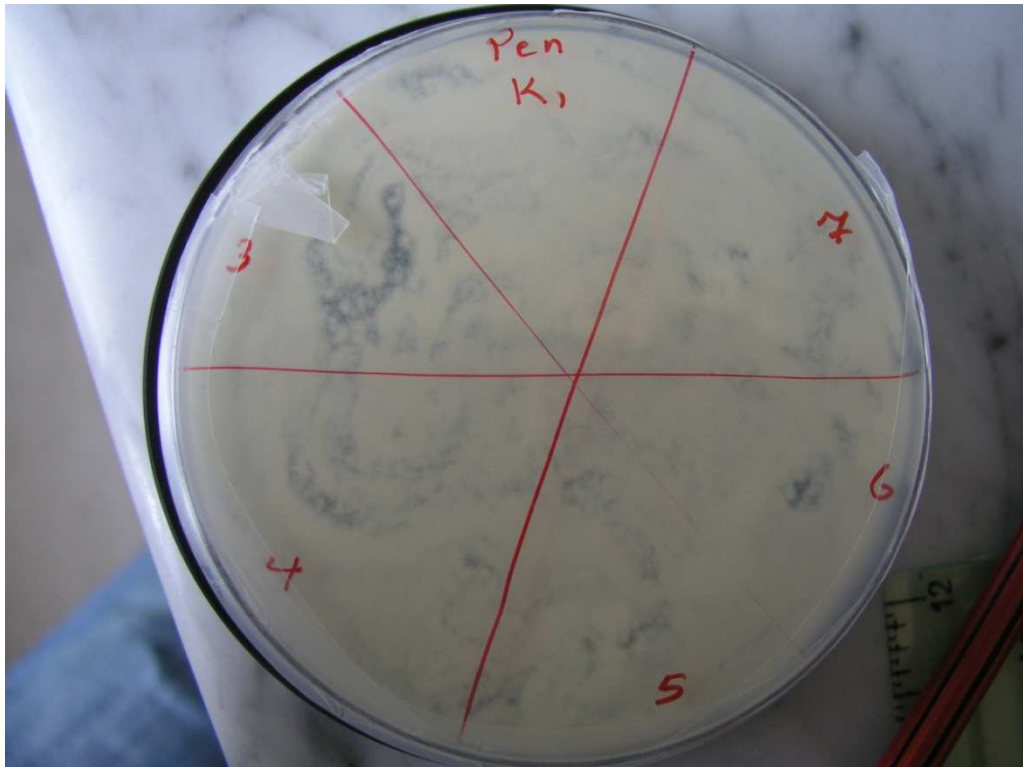
الصورة (7) تأثير زيت الزعتر في بكتيريا *Staphylococcus* باستخدام التراكيز 3-7%



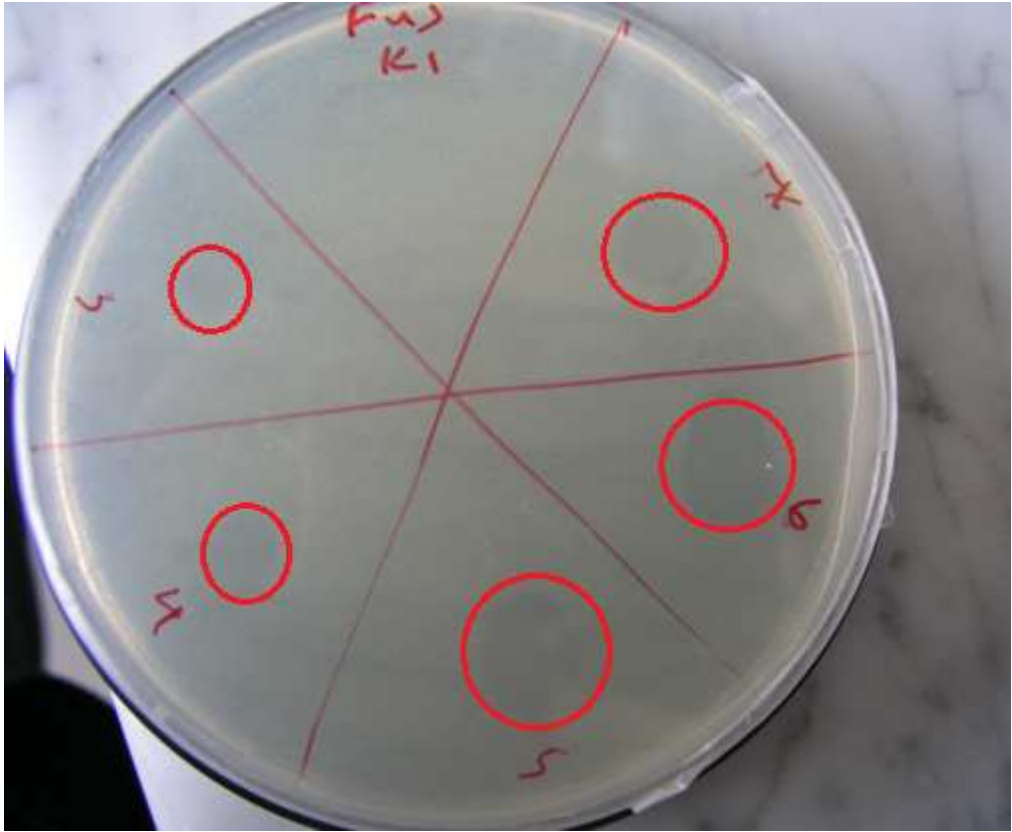
الصورة (8) تأثير زيت الزعتر العطري في فطر *Fusarium* باستخدام التراكيز 3-7%



الصورة (9) تأثير زيت الزعتر العطري في فطر *Penicillium* باستخدام التراكيز 3-7%



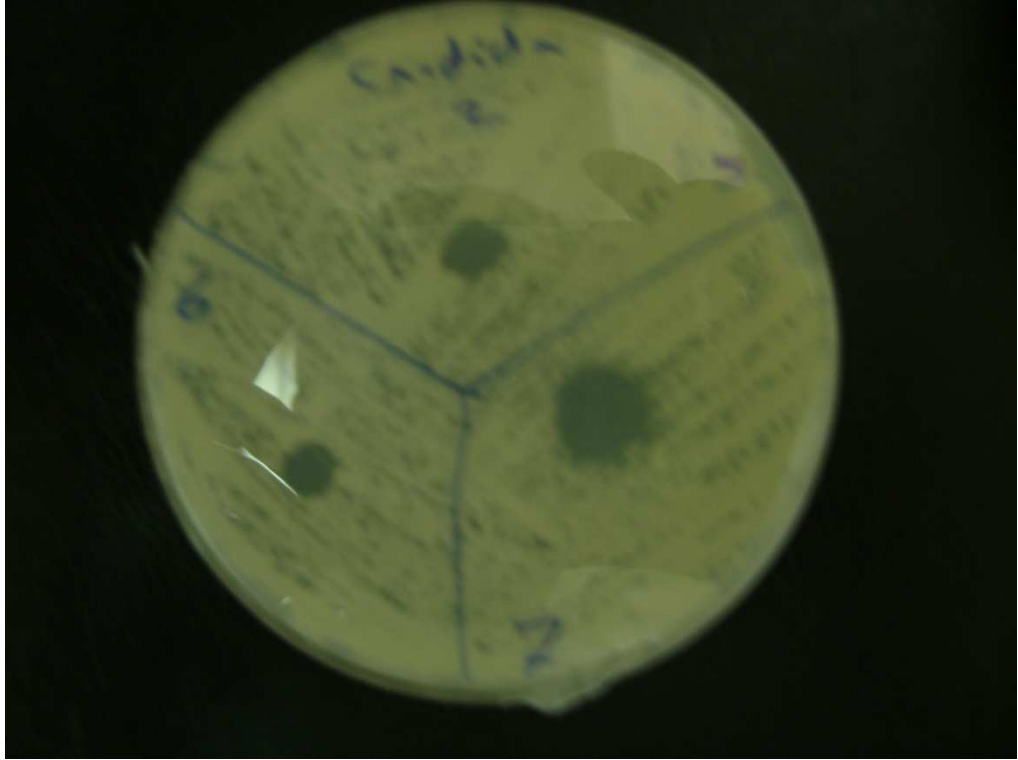
الصورة (10) تبين عدم وجود تأثير لزيت إكليل الجبل العطري في فطر *Penicillium*



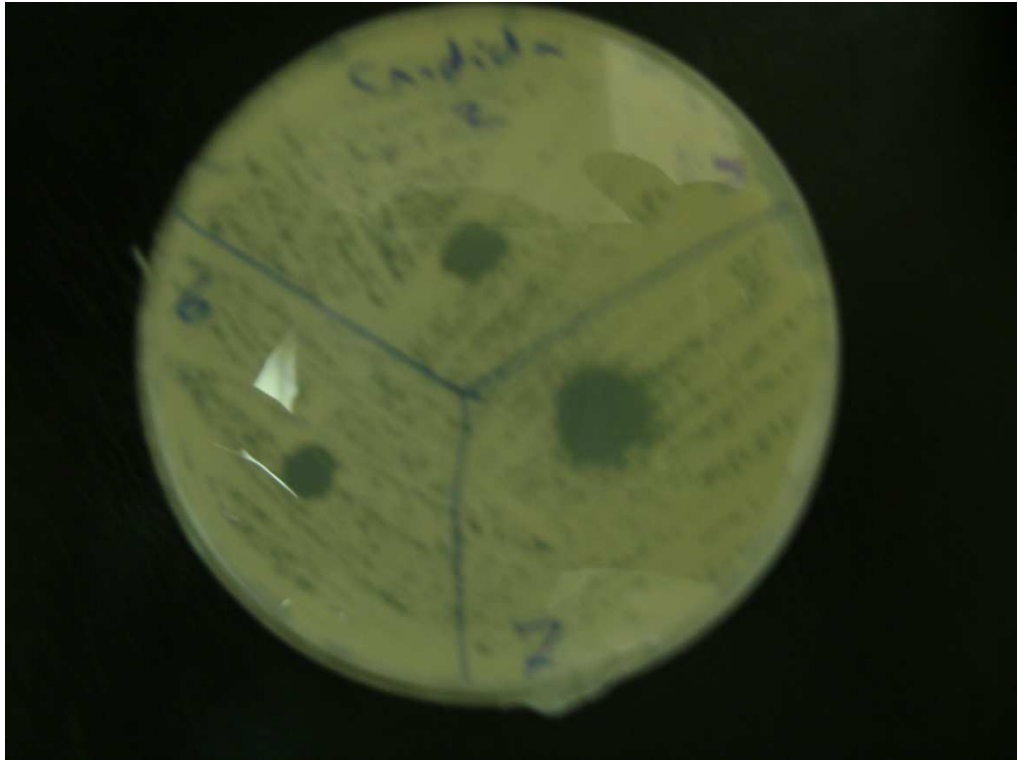
الصورة (11) تأثير زيت إكليل الجبل في فطر *Fusarium* باستخدام التراكيز 3-7%



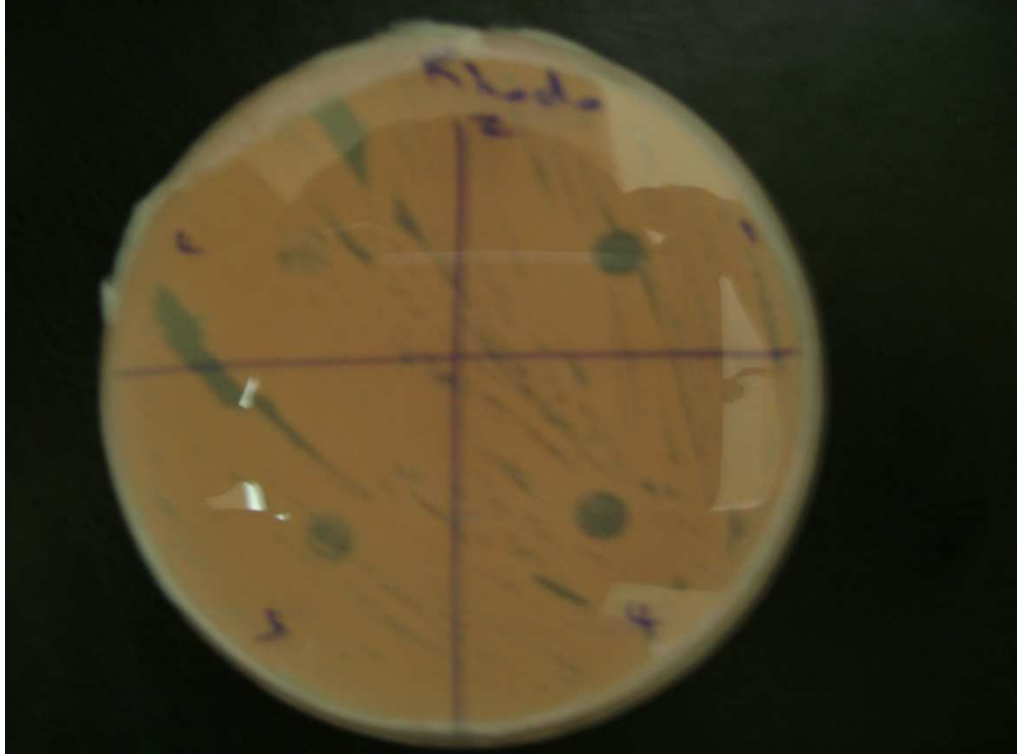
الصورة (12) تأثير زيت الزعتر العطري في خميرة *Candida* باستخدام التراكيز 1-4%



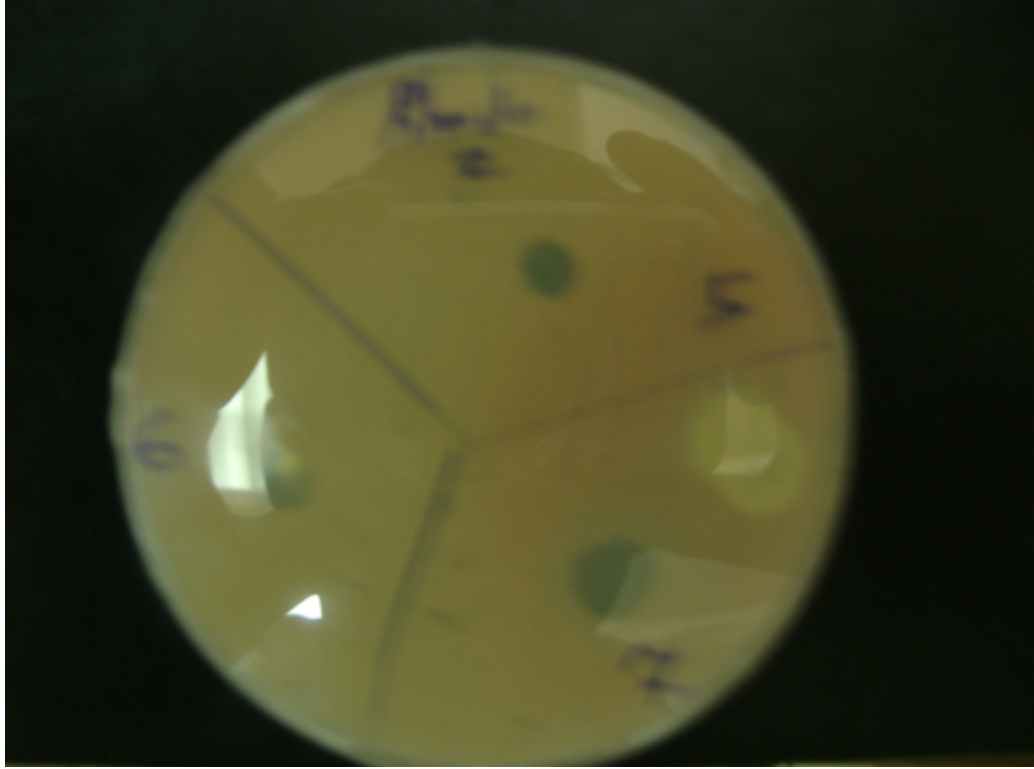
الصورة (13) تأثير زيت الزعتر العطري في خميرة Candida باستخدام التراكيز 5-7%



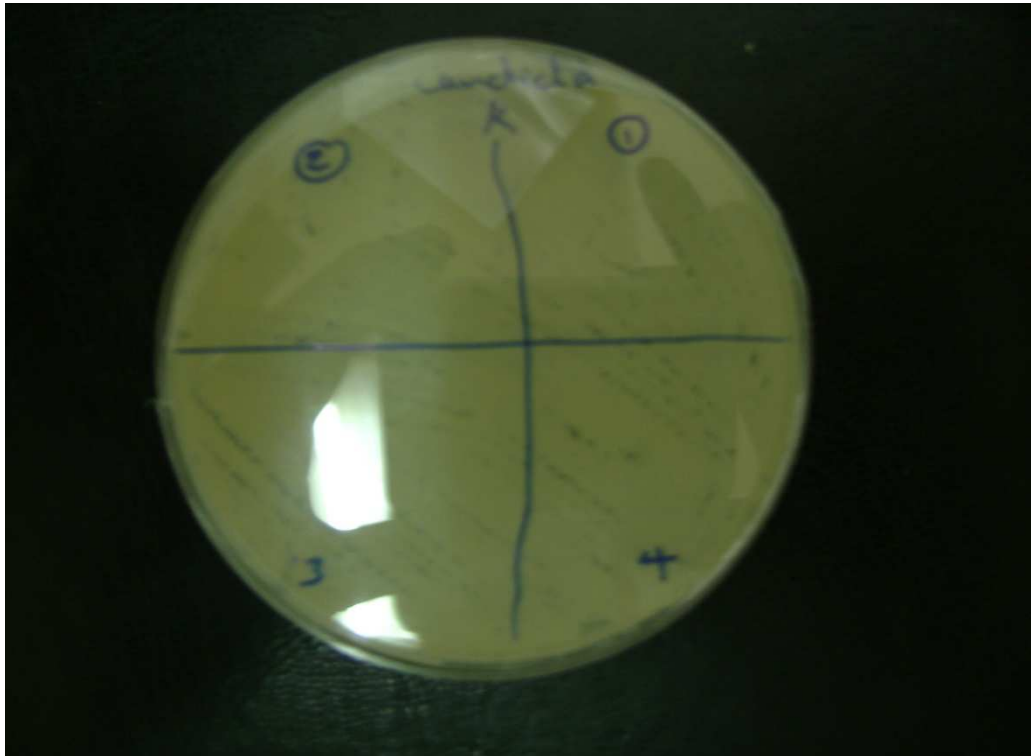
الصورة (13) تأثير زيت الزعتر العطري في خميرة Candida باستخدام التراكيز 5-7%



الصورة (14) تأثير زيت الزعتر في خميرة *Rhodotorula* باستخدام التراكيز 1-4%



الصورة (15) تأثير زيت الزعتر في خميرة *Rhodotorula* باستخدام التراكيز 5-7%



الصورة (16) تبين عدم وجود تأثير لزيت إكليل الجبل بالتركيز 1-4% في خميرة *Candida*



الصورة (17) تبين عدم وجود تأثير لزيت إكليل الجبل العطري في خميرة Rhodotorula