مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (5) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (5) 2017

Inhibitory effect of the oil extract of Nigella Sativa, Rhas Coriaria and Piper Nigrum in the growth of the bacteria pseudomonas causing spoilage Trout

Dr. Abdu Alazes Arwana[1]
Khaldoun Alkoujah[2]

(Received 1 / 2 / 2017. Accepted 10 / 9 /2017)

□ ABSTRACT □

The research aims to study the possibility of prolonging the period of keeping fish meat (trout) Using treated extracts of the oily plant of Nigella Sativa, Rhas Coriaria and Piper Nigrum, as well as to curb the role of germs pseudomonas in fish flesh spoilage through conservation radiator with over the counter effect of oil . The samples of fish meat which studied have dived in the oil extracts for one minute and then preserved at a temperature of 4 ± 1 ° C for 15 days. It has been studing the effect of different oily extracts during the extended conservation 0, 3, 7, 10 and 15 days in a bacterial load, including the total enumeration of spores in a way (ISO 4833) and total enumeration of pseudomonas. It was also identified the value of pH and some sensory and physical qualities of meat such as color, smell and texture and taste. The results showed that the oily extracts have effectively influenced the lengthening keep trout, while remaining fresh and sensual qualities of having good for more than 10 days compared to the control, which did not exceed a period of 7 to save the day. Treatment sample showed oil extracted by Nigella Sativa recipes better quality during periods of conservation and the best inhibitor to the growth of the bacteria pseudomonas in the cooling temperature 4 ± 1 ° C .

Keywords: : pseudomonas , trout, oily extracts.

[1] **Professor, Meat hygiene , Faculty of Veterinary Medicine ,Hama University ,Syria.**
[2] **Postgraduate student (Phd) , Faculty of Veterinary Medicine ,Hama University ,Syria.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (5) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (5) 2017

التأثير التثبيطي للمستخلص الزيتي لنبات الحبة السوداء والسماق والفلفل الأسود على نمو جراثيم الزوائف المسببة لفساد سمك الترويت

الدكتور عبد العزيز عروانة[3]
خلدون القوجة[4]

(تاريخ الإيداع 1 / 2 / 2017. قبل للنشر في 10 / 9 / 2017)

□ ملخّص □

يهدف البحث إلى دراسة إمكانية إطالة مدة حفظ لحوم الأسماك (الترويت) عن طريق معاملته بالمستخلصات الزيتية لنبات الحبة السوداء والسماق والفلفل الأسود وكذلك كبح دور جراثيم الزوائف في فساد لحم السمك خلال الحفظ المبرد من خلال الأثر المضاد للمستخلصات الزيتية عليها. حيث غطست عينات لحوم الأسماك المدروسة بالمستخلصات الزيتية لمدة دقيقة واحدة ثم حفظت عند درجة 1±4 م° مدة 15 يوم. دُرِسَ تأثير المستخلصات الزيتية المختلفة خلال مدد الحفظ 0 و 3 و 7 و 10 و 15 يوم على الحمولة الجرثومية بما فيها التعداد الكلي للجراثيم بطريقة (ISO 4833) والتعداد الكلي لجراثيم الزوائف. كما تم تحديد قيمة الـ pH وبعض الصفات الحسية والفيزيائية للحم كاللون والرائحة والقوام والطعم. وقد بينت النتائج أن المستخلصات الزيتية قد أثرت تأثيراً فعالاً في إطالة مدة حفظ سمك الترويت مع بقائه طازجاً وامتلاكه صفات حسية جيدة مدة تزيد على 10 يوم مقارنة بالشاهد الذي لم تتجاوز مدة حفظه 7 يوم . وقد أظهرت العينة المعاملة بالمستخلص الزيتي للحبة السوداء أفضل صفات جودة خلال مدد الحفظ وأفضل مثبط لنمو جراثيم الزوائف في درجة حرارة التبريد1±4 م°.

الكلمات المفتاحية: الزوائف ، سمك الترويت ، المستخلصات الزيتية.

[3] أستاذ صحة اللحوم – كلية الطب البيطري – جامعة حماة– سورية.
[4] طالب دراسات عليا (دكتوراه) – كلية الطب البيطري – جامعة حماة – سورية.

مقدمة:

تعد لحوم الأسماك من اللحوم البيضاء سهلة الهضم غنية بالبروتين والأحماض الأمينية والفيتامينات وفقيرة بالدهون (اذا ما قورنت بلحوم الأبقار والاغنام) وذلك يمثل جانباً ايجابياً صحياً للإنسان (**Sotelo and Perez, 2003**) بالإضافة لذلك فإن الأسماك تحتوي على كميات مختلفة من الأحماض الدهنية غير المشبعة من نوع أوميغا-3 (**Watanabe,1982**) وتمتاز الحموض الدهنية غير المشبعة وخاصة أوميغا-3 بأنها ذات فائدة كبيرة لصحة الإنسان بسبب عدم قدرة الكبد على تصنيعها فقد بين (**Harris,2004**) أن نواتج استقلاب الأحماض الدهنية أوميغا-3 في جسم الإنسان تعمل على الوقاية من أمراض القلب الوعائية والتاجية، كما تمتاز أوميغا-3 بأن لها تأثيراً في خفض الغلسيريدات الثلاثية في الدم إلى 20% وذلك من خلال الموازنة بين تخزين الغلسيريدات الثلاثية واستقلابها (**Woodman *et al.*,2002**) .

يولي عالمنا اليوم اهتماماً نوعياً خاصاً بالأسماك وذلك عبر إدراك مهم لإجراءات الأمن الحيوي وتطبيقاته التي تتصل مباشرة بسلامة الأغذية والذي يشكل نهجاً استراتيجياً متكاملاً يشمل أطر السياسات والأطر التنظيمية لتحليل المخاطر وادارتها في القطاعات المتنوعة كسلامة الأغذية (**Peeler 2005**) علاوة على الأهمية الكبيرة في توفير الأيدي العاملة والسلامة الصحية للمستهلك (**FAO 2007**) وإن الاستزراع السمكي يتطور في العالم بسرعة كبيرة (**Nierentz 2007**) حيث أن متوسط استهلاك الفرد سنوياً من الأسماك يختلف باختلاف البلدان ومقدار وعيها لأهمية الأسماك في بناء الهرم الغذائي حيث يصل متوسط استهلاك الفرد من الأسماك سنوياً إلى (35,9 Kg) في اليابان في حين يصل في البلاد العربية إلى حوالي (10كغ) سنوياً وقد وصل نتاج الزراعة المائية على مستوى العالم إلى ما يقارب (42,1) مليون طن (**FAO 2007**)

إن عملية تخزين الأسماك لفترات طويلة على درجات حرارة بحدود (+4) مئوية داخل البرادات أدى إلى فساد تلك الأسماك بالجراثيم وحدوث أكسدة وتزنخ في الدهون الموجودة فيها وهي مسؤولة عن التغيرات غير المرغوبة في طعمها ولونها ورائحتها ومن أنواع الجراثيم نذكر الصيفرية والزائفة والضمة والتي يمكن أن تأتي عن طريق الجهاز الهضمي (**Sikorski, 1990**) . إن المواصفات القياسية العالمية تنص على أنه يجب ألا يزيد العدد الكلي للجراثيم في لحم السمك عن 5×10^5 في الغرام الواحد.

يعتبر سمك الترويت من أسماك المياه العذبة وينتمي إلى عائلة السلمون ويتميز بوجود بقع سوداء صغيرة على الظهر ولونه يختلف باختلاف البيئة (**Cowx,2005**) ، الموطن الأصلي لسمك الترويت هو أنهار المياه العذبة وبحيرات شاطىء المحيط الهادي في أمريكا الشمالية وآسيا وهو يستوطن في 82 بلد حول العالم لأنه يستطيع تحمل التغيرات البيئية المختلفة (**Woynarovich *et al.*,2011**) .

تعد جراثيم الزوائف العائدة للعائلة Pseudomonociaceae من الكائنات المجهرية الواسعة الانتشار في الطبيعة إذ تتواجد في التربة والمياه وعلى بعض النباتات وفي الإنسان والحيوانات المختلفة وهي رمية التغذية تستطيع التكاثر في البيئات الرطبة دون الحاجة للمواد الغذائية المعقدة (**Lennette *et al.*,1985**)

جراثيم الزوائف سالبة لصبغة غرام، هوائية اجبارية متحركة وغير مكونة للمحفظة تعطي تحللاً كاملاً حول المستعمرات على وسط آغار الدم أثناء نموها عليه. (**Kiska *and* Gilligan.,2003**)

تفرز جراثيم الزوائف pseudomonas العديد من الصبغات مثل صبغات pyocyanin ,pyomelanin ,pyoverdin ,pyorubin (**Holt *et al.*,1994**)

جدول(1): الاختبارات الكيمياحيوية لبعض أنواع الزوائف (Cowan *and* Steel,1974)

نوع الزائفة	النمو على ماكونكي	انتاج الصباغ	الأوكسيداز	النمو بدرجة حرارة		الجيلاتين	اليوريا	تخمير			تحليل الأرجينين
				+5م	+42م			الغلوكوز	لاكتوز	مالتوز	
P. aeruginosa	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+
P. fluorescens	+	+	+	+	−	+	(+)	+	−	−	+
P. putida	+	+	+	(+)	−	−	(+)	+	−	(−)	+
P. cepacia	+	−*	+	−	(+)	+	+	+	+	+	−
P. maltophilia	+	−	(−)	−	−	+	−	(−)	−	+	−
P. stutzeri	+	−	+	(+)	(+)	−	(+)	+	−	(+)	(+)

+ = ايجابي التفاعل. (+) = معظم الأنواع ايجابية. − = سلبي التفاعل. (−) = معظم الأنواع سلبية.

−* = بعض الأنواع تنتج صبغة مائلة للأصفر.

نباتات الدراسة:

الحبة السوداء: اسمها العلمي Nigella Sativa تنتمي إلى العائلة الشقائقية وهي بذور لعشبة حولية تعلو 30سم وتزرع في كثير من أنحاء آسيا ومنطقة البحر المتوسط ، تحتوي البذور على 40% من الزيت الثابت وحوالي 1.4% من الزيت الطيار وبروتينات وقلويدات وصابونين (**Chevallier,1996**) . أظهرت بذور الحبة السوداء فعالية مضادة للأكسدة وفعالية مضادة للجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة غرام (**Hosseinzadeh *et al.*,2007**)

السماق: اسمه العلمي Rhus Coriaria نبات من ذوات الفلقتين يعود إلى الفصيلة البطمية يكون بشكل أشجار أو شجيرات صمغية راتنجية (**Duke *et al.*,2003**) التركيب الكيميائي للسماق يختلف تبعاً لأجزاء النبات نفسه إذ تحتوي الثمار على نسبة عالية من حامض الليمون والخل والماليك وهذا ما يكسبها طعماً حامضاً وقد تمّ استخدام السماق كمضاد جرثومي (**Nimril *et al.*,1999**)

الفلفل الأسود: اسمه العلمي Piper Nigrum تعدّ ثمار الفلفل الأسود الجافة ذات اللون الأسود والمسماة بكرات الفلفل الأوسع انتشاراً كبهارات في العالم يحتوي الزيت العطري للفلفل الأسود على العديد من المواد الفعالة والتي أثبتت الدراسات أن لها دور كمضادات للأكسدة وكمضادات للأحياء الدقيقة (**Pundir *and* Jain,2010**)

تتجلى مظاهر فساد اللحوم بنمو الجراثيم وتراكم نواتج عملياتها الاستقلابية التي قد تظهر على شكل ألوان وروائح غير مرغوبة بالإضافة إلى تغير ملمس السطح. وهنالك العديد من الأحياء الدقيقة القادرة على افساد اللحوم كالجراثيم المحبة للحرارة المتوسطة مثل الإمعائيات والمكورات والجراثيم المحبة للبرودة مثل الزوائف وجراثيم حمض اللبن فضلاً عن الخمائر والفطريات. (**Del Rio,2007**)

التقييم الحسي من لون وقوام ورائحة وملمس للحوم الأسماك هو أحد المعايير التي تشير إلى فساد اللحوم (**AMSA,1995**).

وكذلك فإن اختبار رقم الحموضة(pH) هو من أحد المؤشرات التي تدل على الفساد(**AOAC,1984**) واختبار التعداد العام الجرثومي (**APHA,1992**).

واعتمادا على هيئة المواصفات والمقاييس السورية لعام 2007م التي حددت الحد الأقصى المسموح للتعداد الكلي للجراثيم في لحم الأسماك المبردة وهو 10^7/غ.

إن هيئة المواصفات والمقاييس السورية التابعة لوزارة الصناعة قد حددت عام (2007) نقطة (درجة) فساد الأسماك ومنتجاتها وذلك بالإعتماد على:

1- الخواص الحسية والفيزيائية (اللون - القوام - الطعم - الرائحة).

2- درجة تركيز الايون الهيدروجيني للحم السمك (pH).

3- التعداد العام الجرثومي للحم السمك.

ففي التعداد العام الجرثومي مثلاً عندما يصل(10^7 فما فوق/غ) من العينة تعتبر فاسدة (غير صالحة للاستهلاك) أما بالنسبة إلى درجة الحموضة فعندما تكون ما بين (6.2 - 6.4) فتعتبر فاسدة (غير صالحة للاستهلاك) بالإضافة للخواص الحسية غير الطبيعية و خاصة (الملمس - القوام - الرائحة) والتي تجعل الأسماك فاسدة.

أهمية البحث وأهدافه:

1-عزل وتصنيف جراثيم الزوائف Pseudomonas spp الموجودة في لحوم سمك الترويت أثناء الحفظ المبرد على الدرجة 1±4 م°.

2- دراسة مظاهر التضاد بين جراثيم الزوائف المعزولة من لحوم الأسماك المدروسة والمستخلصات الزيتية لنبات الحبة السوداء والسماق والفلفل الأسود لتحديد أفضلها من ناحية القدرة التثبيطية.

3- امكانية إطالة فترة حفظ لحوم الأسماك المعاملة بالمستخلصات الزيتية للنباتات السابقة إلى أطول فترة ممكنة خلال الحفظ المبرد على الدرجة 1±4 م° مع المحافظة على صلاحيتها للاستهلاك البشري.

طرائق البحث ومواده:

العينات:

أُخِذَتْ العينات من أماكن بيع مرخصة للأسماك من السوق المحلي في الفترة الواقعة بين 2015/2/2 ولغاية 2015/10/12 حيث نقلت جميع العينات مبردة في عبوات معقمة إلى المخبر وشملت العينات (25) فرخ سمك ترويت.

تم تقطيع جميع العينات التي عزلت منها جراثيم الزوائف في وسط نظيف ومعقم إلى مكعبات بواقع 50 غ تقريباً ثم وضعت بالمستخلصات الزيتية للأعشاب العطرية المدروسة لمدة دقيقة واحدة ثم نقلت للحفظ بدرجة حرارة التبريد 1±4 م° لإجراء الاختبارات الحسية والفيزيائية والكيميائية والجرثومية على فترات متلاحقة أثناء التجربة.

تم تداول العينات وفق المواصفة القياسية السورية رقم (2009/743) الخاصة بالقواعد العامة لصحة الغذاء.

العزل الجرثومي

تم أخذ 10غ من كل عينة وأضيف لها 90 مل من سترات الصوديوم ووضعت في أكياس خاصة معقمة (أكياس ستوماخر) حيث تم تجنيس العينة باستخدام جهاز ستوماخر لمدة 90 ثانية (**Quinn *et al.*,1999**)

ثم أخذ 0,1 مل من هذا التخفيف (10/1) ولكل عينة وزرع على وسط الآغار المغذي والآغار المدمى وآغار ماكونكي وبيئة السترميد آغار الخاصة بالزوائف ثم حضنت الأطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة. **(Macfaddin,2000)**

الفحص المجهري

تم اجراء الفحوص المجهرية وفقاً للطرق العلمية المتبعة لتشخيص الجراثيم حيث تم تحضير مسحات جرثومية من كل وسط انتقائي وصبغت بصبغة غرام للتعرف الأولي على نوع الجرثومة النامية على الوسط ثم تم بعد ذلك تنقية الجراثيم. **(Holt *et al.*,1994)**

التشخيص الكيمياحيوي

اجريت عدد من الفحوصات الكيمياحيوية الأولية للعزلات من المنابت الانتقائية إذ تم استخدام عدة فحوصات منها فحص الإندول، الأوكسيداز ، الكاتالاز ، انتاج اليوريا ، تميع الجيلاتين ، تخمير سكر (الغلوكوز، اللاكتوز، المالتوز)، تحليل الارجنين، النمو على الدرجة +5م° ، النمو على الدرجة +42م°. **(Cowan *and* Steel,1974)**

طريقة تحضير المستخلصات الزيتية للأعشاب العطرية

تمّ الاستخلاص بوضع (40غ) من مسحوق النبات العطري في كشتبان الاستخلاص الذي وضع في جهاز الاستخلاص المستمر (Soxhlet) واستخدم (500 مل) هكسان عند الدرجة 70م° واستمرت عملية الاستخلاص 8 ساعات ، بعد ذلك تمّ تبخير المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل عند الدرجة 45م° ثمّ حفظ الزيت في أوعية زجاجية معتمة في البراد لحين الاستخدام. **(Desmukh *and* Borle,1975)**

طريقة اختبار فعالية المستخلصات الزيتية لنباتات الدراسة ضد جراثيم الزوائف

طريقة الحفر: Wells Method

استعمل ثاقب الفلين المعقم (Cork borer) لعمل حفر في طبق مولر هنتون الصلب Himedia / Mueller Hinton agar المزروع بجراثيم الزوائف المعزولة ثم ملئت الحفر بـ 40 مايكرو ليتر من مستخلص الزيت. ثم حضنت على الدرجة 37م° لمدة 24 ساعة وتم عمل ثلاث مكررات للمقارنة **(Vignolo *et al.*,1993)** .

تحديد التركيز المثبط الأدنى (Minimum Inhibition Concentration MIC) والتركيز القاتل الأدنى (Minimum Bactericidal Concentration MBC)

حضر وسط مولر هنتون الصلب وعقم بجهاز الاوتوغلاف على الدرجة 121م° لمدة 15 دقيقة ثم برد الوسط حتى الدرجة 45م° وأضيف إليه كمية من المستخلص الزيتي ليكون التركيز النهائي (0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 – 16 – 32 – 64) % ومزجت جيداً وصبت في أطباق بيتري المعقمة حيث وضعت الأطباق لمدة نصف ساعة في الثلاجة عند الدرجة +4م لتتصلب ثم زرعت بجراثيم الزوائف المعزولة لدينا وذلك بأخذ 5 مايكرو ليتر من المعلق الجرثومي بتركيز 10^5 خلية مكونة للمستعمرة/مل حيث تم تحضيره بأخذ 2–4 مستعمرات من الزوائف المعزولة لدينا ووضعت في المحلول الملحي الفيزيولوجي المعقم بتركيز 0.85% وتمت مقارنته بأنبوبة ماكفرلاند رقم 0.5 والحاوية على (1.5* 10 خلية/مليلتر)ثم حضنت الأطباق على الدرجة 37م° مدة 24 ساعة **(Miles *and* Amyes,1996)**.

حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) كأقل تركيز من المستخلص الزيتي يثبط النمو المرئي للزوائف وحدد التركيز القاتل الأدنى(MBC) كأقل تركيز من المستخلص الزيتي يقتل جراثيم الزوائف حيث سجلت النتائج بناء على وجود النمو (+) وعدم وجود النمو (−) (**CLSI,2013**).

دراسة أثر المستخلصات الزيتية لنباتات الدراسة على صفات الجودة للحوم الأسماك(الترويت)

أولاً: اختبارات الجودة الحسية والفيزيائية (اللون – القوام – الرائحة – الطعم)

تم تقطيع لحوم الأسماك بجو معقم إلى قطع صغيرة وبوزن 50 غ للقطعة الواحدة وفي أوعية زجاجية معقمة أضيفت هذه القطع إلى كمية مناسبة من المستخلص الزيتي ثم تم تحريك هذه القطع بهدوء لمدة دقيقة واحدة للتأكد من ملامسة المستخلص الزيتي لكل السطح الخارجي لهذه القطع . وأجريت عملية النقع لكل مستلخص زيتي على حده ، بعد ذلك نقلت جميع العينات المعاملة بعد تصفيتها إلى أكياس بلاستيكية معقمة ، ثم حفظت الأكياس في براد درجة حرارته 1±4 م° وأجريت الاختبارات الحسية للعينات بعد (0 – 3 – 7 – 10 – 15) يوم من الحفظ كما و تم تعبئة بعض القطع من لحوم الأسماك بدون معاملة بالمستخلصات كشاهد للتجربة .

وقد تمّ تقييم الصفات الحسية التي تتضمن (اللون والقوام والطعم والرائحة) بواسطة لجنة مكونة من 9 أشخاص مدربين لإجراء الفحوصات الحسية وذلك باستخدام طريقة Hedonic Scale وقد أعطيت كل صفة من الصفات الحسية درجة من 1 إلى 5 بحيث تعني الدرجة 1 أن الصفة (سيئة جداً) والدرجة 2 (سيئة) والدرجة 3 (مقبول) والدرجة 4 (جيد) والدرجة 5 (جيد جداً) (**Kenawi *et al.*,2005**)

ثانياً: اختبارات الجودة الجرثومية

وشملت التعداد العام للجراثيم في غرام واحد من اللحم وكذلك التعداد العام للزوائف كما وتم تحديد التلوث الجرثومي الأولي للعينات حيث جرى التحري عن السالمونيلا تبعاً لطريقة (**ISO 6579 , 2002**) وجرى التحري عن جراثيم الكوليفورم باستخدام بيئة Violet Red Bile Agar (VRBA) (**ISO 4831 , 2006**) وعن الجراثيم اللاهوائية باستخدام بيئة Thioglycollate Agar (**ISO 7937,2004**) كما جرى عدّ الخمائر والفطريات باستخدام بيئة Potato Dextrose Agar (PDA) (**ISO 6611,2004**) والبيئات السابقة هي عبارة عن بيئات جاهزة مصدرها شركة MERK الألمانية. وقد اعتمدنا هذه الأنواع من الفحوص بناءً على الأسس المعتمدة لتقدير صلاحية العينات للتجربة الموضوعة من قبل هيئة المواصفات والمقاييس السورية لعام (2007).

اعداد التخفيفات المطلوبة للتعداد العام الجرثومي

حضرت التخفيفات باتباع طريقة (**ISO 6887.2,2003**) بوزن 25 غ من اللحم في أكياس ستوماخر Stomacher وأضيف لها 225 مل من بيئة (Buffer Peptone Water BPW) المعقمة وتمّ تجنيس العينة في جهاز ستوماخر لمدة 90 ثانية لتحضير التخفيف الأول (10^{-1}) ثم نقل 1 مل من التخفيف الأول إلى أنبوب يحوي 9 مل من بيئة (PW) للحصول على التخفيف الثاني (10^{-2}) وهكذا حتى تم تحضير ست محضرات مخففة من (10^{-2} ، 10^{-7})

اختبار التعداد العام الجرثومي

أجري الاختبار بالاعتماد على المواصفة الدولية (**ISO 4833 , 2003**) بنقل 1 مل من كل تخفيف من المحضرات الستة إلى أطباق بيتري المعقمة ثم صبت بيئة الآغار المغذي(Plate Count Agar (PCA إلى جميع الاطباق بمعدل 15 مل تقريباً لكل طبق بعد تركها لتبرد حتى الدرجة 50 م° ثم حركت الأطباق أصولياً وتركت

لتتصلب ثم حضنت على الدرجة 35م° لمدة 48 ساعة وقرأت النتائج من خلال عدّ المستعمرات النامية في الأطباق التي تحتوي 20 – 200 مستعمرة وجرى تقدير اعداد الجراثيم بضرب عدد المستعمرات بمقلوب التخفيف لاستخراج العدد في الغرام الواحد من اللحم.

اختبار التعداد العام لجراثيم الزوائف

تم ذلك حسب ما ورد في (**ISO 13720 , 2010**) حيث استخدمنا بيئة (Cetrimide Agar) وقرأت النتائج بنفس الطريقة السابقة (طريقة عدّ المستعمرات) بعد التأكد من المستعمرات النامية في الأطباق من ناحية الشكل ومن خلال التأكيد بالاختبارت الكيمياحيوية.

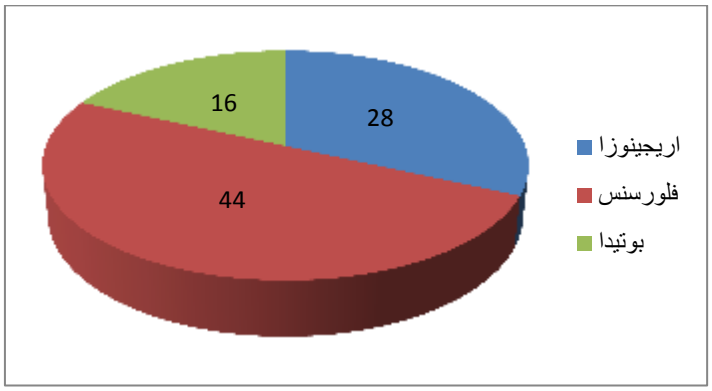
ثالثاً: اختبارات الجودة الكيميائية

الرقم الهيدروجيني pH :

تمّ وزن 10 غ من كل عينة وأضيف لها 100 مل ماء مقطر ومزجت جيداً وقيس الرقم الهيدروجيني باستخدام جهاز قياس درجة الحموضة الالكتروني HM-60 G (pH Meter). (**Kirk *and* Sawyer,1991**)

النتائج والمناقشة:

أظهرت النتائج الحصول على 22 عزلة من جراثيم الزوائف من أصل 25 عينة من سمك الترويت وبنسبة قدرها 88%. حيث حصلنا على 7 عزلات للزائفة اريجينوزا و 11 عزلة للزائفة فلورسنس و4عزلات للزائفة بوتيدا وبنسب قدرها (28، 44، 16)% على التوالي من سمك الترويت.



شكل (1): نسبة تواجد بعض أنواع الزوائف في سمك الترويت

بينت نتائج الزرع الجرثومي ظهور مستعمرات مخاطية كبيرة الحجم نسبياً حالة للدم بشكل كامل بعد زرعها على وسط آغار الدم بعد فترة حضن 24 ساعة بدرجة 37م وظهرت بعض المستعمرات النامية على وسط آغار ماكونكي متوسطة الحجم مع تغير في لون الوسط أما النمو على المنبت الخاص بجراثيم الزوائف فقد أعطى مستعمرات رمادية اللون وهذه النتيجة تتفق مع الملحق المرفق من قبل الشركة المصنعة. وأعطت الجراثيم لون أزرق مخضر عند زرعها على وسط الآغار المغذي ، كما ظهرت تحت المجهر بشكل عصوي وسالبة لصبغة غرام.

ومع ملاحظة نتائج الفحوصات الكيمياحيوية لهذه العزلات فقد أعطت تفاعلاً موجباً لفحوصات الكاتالاز والأكسيداز وتحليل الارجنين وتخمير الغلوكوز وتحليل اليوريا والنمو على الدرجة +5م° وتمييع الجيلاتين بالنسبة للزائفة فلورسنس وهي نفس الخصائص البيوكيميائية للزائفة اريجينوزا باستثناء النمو على الدرجة +5م° حيث لم نلاحظ نموها

على هذه الدرجة بل على الدرجة +42م° بينما كان اختبار تمييع الجيلاتين والنمو على الدرجة +42م° سالباً بالنسبة للزائفة بوتيدا. أما بقية الاختبارات من اختبار الاندول وتخمير سكر اللاكتوز وسكر المالتوز فقد كانت سالبة لجميع العزلات .

نتائج أثر التضاد بين جراثيم الزوائف والمستخلصات الزيتية لنباتات الدراسة

بعد إجراء عملية العزل والزرع الجرثومي للزوائف المستحصل عليها من عينات لحم سمك الترويت ووضع الخلاصات الزيتية للنباتات المدروسة في حفر منبت مولر هنتون والتحضين على الدرجة 37 م° وقراءة النتائج بعد 24 ساعة كانت النتائج كما يلي:

جدول(2): معدلات أقطار مناطق التثبيط (ملي متر) للمستخلصات الزيتية لنباتات الدراسة

الخلاصة الزيتية	قطر التثبط (ملم)
نبات الحبة السوداء	(21 – 22)
نبات السماق	(18 – 19)
نبات الفلفل الأسود	(15 – 16)

تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC)

تعد هذه الطريقة من أهم الطرائق لتحديد الفعالية لكونها طريقة كمية (Quantitative Method) وتستعمل لمعرفة تأثير المواد المراد فحصها في قتل الأحياء المجهرية.

استعملت طريقة التخفيف بالوسط الصلب وذلك لأن استعمال طريقة التخفيف بالوسط السائل قد لوحظ فيها عدم تجانس الزيت مع الوسط بشكل جيد حيث بقيت طبقة الزيت في الأعلى.

جدول(3): قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصات الزيتية المدروسة على جراثيم الزوائف Pseudomonas spp

المستخلصات	(حجم/حجم) % زيت
المستخلص الزيتي للحبة السوداء	4
المستخلص الزيتي للسماق	8
المستخلص الزيتي للفلفل الأسود	16

جدول(4): قيم التركيز القاتل الأدنى (MBC) للمستخلصات الزيتية المدروسة على جراثيم الزوائف Pseudomonas spp

المستخلصات	(حجم/حجم) % زيت
المستخلص الزيتي للحبة السوداء	8
المستخلص الزيتي للسماق	16
المستخلص الزيتي للفلفل الأسود	32

نتائج دراسة أثر المستخلصات الزيتية على صفات الجودة للحوم الترويت

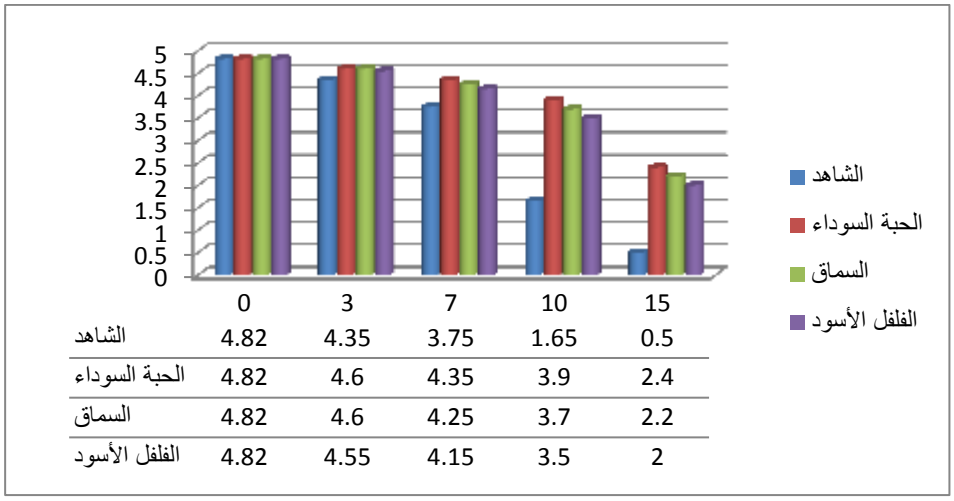
أولا: نتائج اختبارات الجودة الحسية والفيزيائية

يبين الجدول رقم (5) تغيرات الصفات الحسية والفيزيائية في عينات لحوم الأسماك المدروسة المعاملة بالمستخلصات الزيتية لنباتات الدراسة حيث تم دراسة الصفات الحسية والفيزيائية خلال مدد التخزين المختلفة بعد (0 – 3 – 7 – 10 – 15) يوم من الحفظ وقد تبين أن جميع العينات حصلت في بداية الحفظ على درجات متقاربة تعبر عن جودتها وفي اليوم السابع من الحفظ وجد أن عينة الشاهد قد بدأت بالفساد إذ حصلت على الدرجة 3.5 بالنسبة للون والقوام و 4 بالنسبة للطعم والرائحة في حين حافظت باقي العينات على جودتها ، وفي اليوم رقم 10 من الحفظ تبين أن عينة الشاهد قد فسدت تماماً في حين كانت مجمل الصفات الحسية والفيزيائية للعينات المعاملة بالمستخلصات الزيتية بحالة جيدة إلى مقبولة أما في اليوم 15 فقد حصلت الصفات الحسية والفيزيائية للعينات جميعها على درجة سيئة.

جدول(5): الصفات الحسية والفيزيائية للحوم الترويت المعاملة بالمستخلصات الزيتية خلال مدد الحفظ المبرد عند الدرجة 1±4 م°

	مدة الحفظ	المستخلصات الزيتية			
	(يوم)	الشاهد	الحبة السوداء	السماق	الفلفل الأسود
اللون والقوام	0	$4,75\pm0,14^{a}$	$4,75\pm0,14^{a}$	$4,75\pm0,14^{a}$	$4,75\pm0,14^{a}$
	3	$4,20\pm0,15^{a}$	$4,50\pm0,19^{a}$	$4,50\pm0,20^{a}$	$4,50\pm0,20^{a}$
	7	$3,50\pm0,42^{a}$	$4,20\pm0,20^{b}$	$4,10\pm0,17^{b}$	$4,00\pm0,18^{b}$
	10	$1,30\pm0,15^{a}$	$4,00\pm0,16^{b}$	$3,90\pm0,16^{b}$	$3,50\pm0,25^{bc}$
	15	$0,50\pm0,05^{a}$	$2,50\pm0,18^{a}$	$2,30\pm0,20^{a}$	$2,00\pm0,30^{b}$
الطعم والرائحة	0	$4,90\pm0,10^{a}$	$4,90\pm0,10^{a}$	$4,90\pm0,10^{a}$	$4,90\pm0,10^{a}$
	3	$4,50\pm0,20^{a}$	$4,70\pm0,15^{a}$	$4,70\pm0,20^{a}$	$4,60\pm0,35^{a}$
	7	$4,00\pm0,17^{a}$	$4,50\pm0,20^{b}$	$4,40\pm0,15^{b}$	$4,30\pm0,20^{ab}$
	10	$2,00\pm0,30^{a}$	$3,80\pm0,10^{b}$	$3,50\pm0,20^{b}$	$3,50\pm0,25^{b}$
	15	$0,50\pm0,05^{a}$	$2,30\pm0,25^{a}$	$2,10\pm0,30^{a}$	$2,00\pm0,20^{a}$
المتوسط العام	0	$4,82\pm0,12^{a}$	$4,82\pm0,12^{a}$	$4,82\pm0,12^{a}$	$4,82\pm0,12^{a}$
	3	$4,35\pm0,17^{a}$	$4,60\pm0,17^{a}$	$4,60\pm0,20^{a}$	$4,55\pm0,25^{a}$
	7	$3,75\pm0,29^{a}$	$4,35\pm0,20^{b}$	$4,25\pm0,16^{b}$	$4,15\pm0,22^{b}$
	10	$1,65\pm0,22^{a}$	$3,90\pm0,13^{b}$	$3,70\pm0,18^{b}$	$3,50\pm0,21^{bc}$
	15	$0,50\pm0,05^{a}$	$2,40\pm0,21^{b}$	$2,20\pm0,25^{b}$	$2,00\pm0,15^{bc}$

يشير الاختلاف في الاحرف ضمن الصف الواحد إلى وجود فروق معنوية ($P<0,05$)



	0	3	7	10	15
الشاهد	4.82	4.35	3.75	1.65	0.5
الحبة السوداء	4.82	4.6	4.35	3.9	2.4
السماق	4.82	4.6	4.25	3.7	2.2
الفلفل الأسود	4.82	4.55	4.15	3.5	2

شكل(2): تغيرات الجودة الحسية والفيزيائية لعينات لحوم الترويت المعاملة بالمستخلصات الزيتية للنباتات المدروسة

ثانياً: نتائج اختبارات الجودة الجرثومية

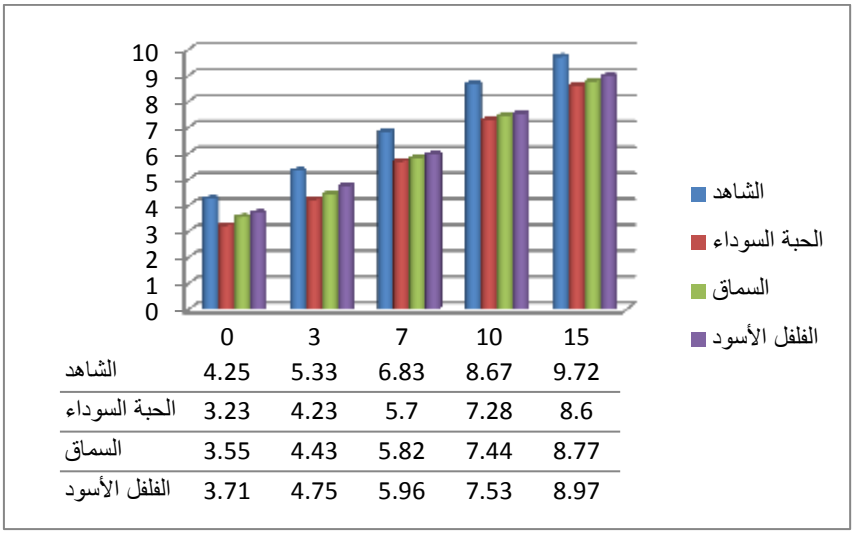
أظهرت نتائج الاختبارات الجرثومية لعينات لحوم الأسماك المدروسة المقطعة في المخبر سلامتها العامة من حيث التعداد العام الجرثومي والخمائر والفطور وغيرها من الاختبارات التي أعطت نتيجة سلبية.

ويبين الجدول رقم (6) أن التعداد الكلي للجرثيم في عينة الشاهد عند الزمن 0 كان 4,25 أما في العينات المعاملة بالمستخلصات الزيتية للحبة السوداء والسماق والفلفل الأسود فكان (3,23 – 3,55 – 3,71) على التوالي ، كما لوحظ تزايد التعداد الكلي للجراثيم في عينات لحوم الأسماك المدروسة جميعها مع ازدياد مدة الحفظ واعتماداً على المواصفة القياسية السورية لعام 2007 التي حددت أن الحد الأقصى المسموح للتعداد الكلي للجراثيم في لحوم الأسماك المبردة هو 7 تبين أن العينات جميعها بقيت تحت هذا الحد حتى اليوم رقم 7 من الحفظ باستثناء عينة الشاهد التي اقتربت من هذا الحد بشكل كبير في اليوم رقم 7 من الحفظ.

جدول(6): التعداد العام الجرثومي log CFU/g في لحوم الترويت المعاملة بالمستخلصات الزيتية خلال مدد الحفظ المبرد 1±4م°

مدة الحفظ		المستخلصات الزيتية		
(يوم)	الشاهد	الحبة السوداء	السماق	الفلفل الأسود
0	$4,25\pm0,18^{a}$	$3,23\pm0,27^{b}$	$3,55\pm0,16^{c}$	$3,71\pm0,04^{d}$
3	$5,33\pm0,29^{a}$	$4,23\pm0,11^{b}$	$4,43\pm0,12^{cb}$	$4,75\pm0,13^{d}$
7	$6,83\pm0,19^{a}$	$5,70\pm0,15^{b}$	$5,82\pm0,23^{b}$	$5,96\pm0,25^{cb}$
10	$8,67\pm0,06^{a}$	$7,28\pm0,13^{b}$	$7,44\pm0,12^{dc}$	$7,53\pm0,13^{d}$
15	$9,72\pm0,26^{a}$	$8,60\pm0,21^{b}$	$8,77\pm0,15^{bc}$	$8,97\pm0,18^{c}$

يشير الاختلاف في الأحرف ضمن الصف الواحد إلى وجود فروق معنوية ($p<0.05$)



	0	3	7	10	15
الشاهد	4.25	5.33	6.83	8.67	9.72
الحبة السوداء	3.23	4.23	5.7	7.28	8.6
السماق	3.55	4.43	5.82	7.44	8.77
الفلفل الأسود	3.71	4.75	5.96	7.53	8.97

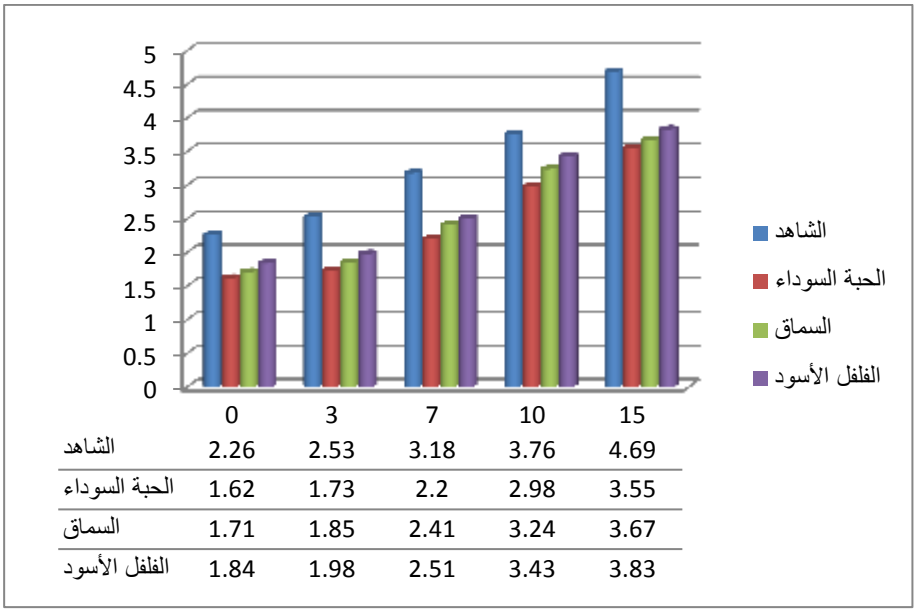
شكل رقم (3): تغيرات الجودة الجرثومية للحوم الترويت المعاملة بالمستخلصات الزيتية

ويشير الجدول رقم (7) إلى تزايد تعداد جراثيم الزوائف في العينات جميعها مع ازدياد مدة التخزين كما يلاحظ أن العينات المعاملة بالمستخلصات الزيتية الثلاثة قد انخفض فيها تعداد جراثيم الزوائف مباشرة بمقدار 0,64 بالنسبة للمستخلص الزيتي لنبات الحبة السوداء و0,55 بالنسبة للمستخلص الزيتي لنبات السماق و0,42 بالنسبة للمستخلص الزيتي لنبات الفلفل الأسود وذلك بالمقارنة مع الشاهد الذي بلغ فيه تعداد جراثيم الزوائف 2,26

جدول(7): تعداد الزوائف log CFU/g للحوم الترويت المعاملة بالمستخلصات الزيتية خلال مدد الحفظ المبرد عند الدرجة 1±4 م°

مدة الحفظ		المستخلصات الزيتية		
(يوم)	الشاهد	الحبة السوداء	السماق	الفلفل الأسود
0	$2,26\pm0,22^{a}$	$1,62\pm0,39^{b}$	$1,71\pm0,17^{bc}$	$1,84\pm0,26^{bc}$
3	$2,53\pm0,19^{a}$	$1,73\pm0,12^{b}$	$1,85\pm0,12^{bc}$	$1,98\pm0,13^{bc}$
7	$3,18\pm0,17^{a}$	$2,20\pm0,25^{b}$	$2,41\pm0,29^{bc}$	$2,51\pm0,35^{bc}$
10	$3,76\pm0,16^{a}$	$2,98\pm0,18^{b}$	$3,24\pm0,12^{bc}$	$3,43\pm0,23^{bc}$
15	$4,69\pm0,13^{a}$	$3,55\pm0,31^{b}$	$3,67\pm0,15^{bc}$	$3,83\pm0,16^{bc}$

يشير الاختلاف في الاحرف ضمن الصف الواحد إلى وجود فروق معنوية ($p<0,05$)



	0	3	7	10	15
الشاهد	2.26	2.53	3.18	3.76	4.69
الحبة السوداء	1.62	1.73	2.2	2.98	3.55
السماق	1.71	1.85	2.41	3.24	3.67
الفلفل الأسود	1.84	1.98	2.51	3.43	3.83

شكل (4): تغيرات تواجد الزوائف في لحوم الأسماك المدروسة المعاملة بالمستخلصات الزيتية

ثالثاً: نتائج اختبارات الجودة الكيميائية

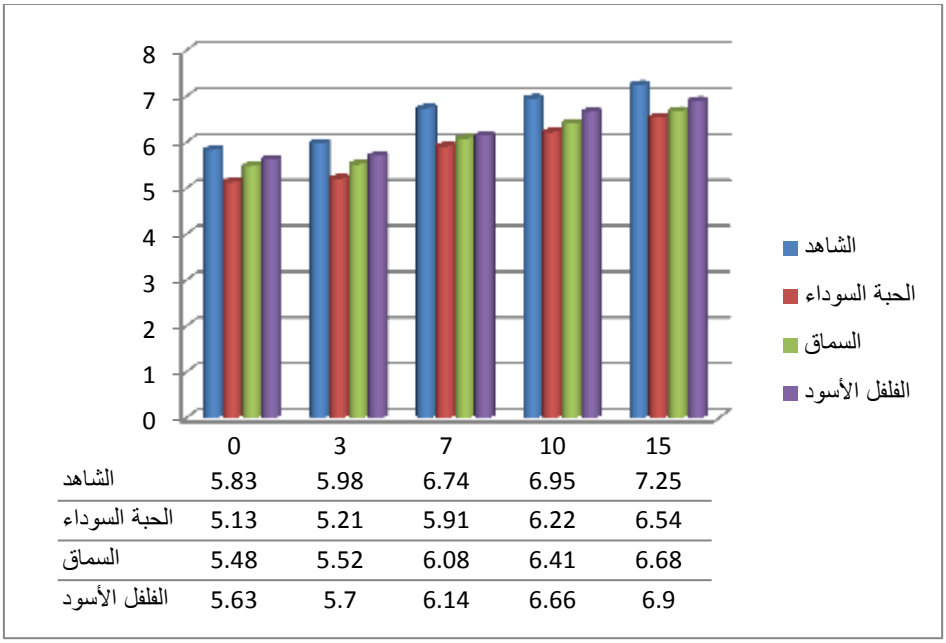
تغيرات الـ pH:

يتبين من الجدول رقم (8) أن قيمة الـ pH قد ازدادت مع ازدياد مدة الحفظ في العينات جميعها وكانت في عينة الشاهد في بداية مدة الحفظ 5,83 وأصبحت في نهاية مدة الحفظ 7,25 ووجد أن إضافة المستخلصات الزيتية لنبات الحبة السوداء والسماق والفلفل الأسود قد خفضت قيمة الـ pH مباشرة إلى (5,13 – 5,48 – 5,36) على التوالي. تعد بعض المراجع الباهاء (رقم الـ pH) مؤشراً على درجة طزاجة لحوم الأسماك إذ يعد لحم السمك عند قيمة pH –6) 5,8) طازجاً بحسب المواصفات الرومانية للسمك الطازج وبعد هذه القيمة يبدأ لحم السمك بالفساد (**Baston *et al.*,2008**) إذ تزداد قيمة الـ pH في لحم السمك بعد حفظه مباشرة نتيجة التفاعلات البيوكيميائية ويقاس رقم الـ pH بعد يوم من الحفظ وذلك لأن قيمة الـ pH لا تكون ثابتة بعد الحفظ مباشرة إذ تتناقص بعد عدة ساعات من الحفظ نتيجة لتفكك السكر المخزن في العضلات أثناء الحياة معطياً حمض اللبن ذو الاساس الحامضي مما يؤدي إلى انخفاض قيمة الـ pH، ثم تعود لتزداد مع ازدياد مدة التخزين نتيجة لتحلل البروتين وزيادة كمية الأحماض الأمينية ذات الأساس القاعدي (القلوي) (**Duclos *et al.*,2007**) . وهذا يتفق مع ما توصلنا إليه من ازدياد رقم الحموضة مع ازدياد مدد التخزين المبرد.

جدول(8): تغيرات الـ pH في لحوم الأسماك المدروسة المعاملة بالمستخلصات الزيتية خلال مدد الحفظ المبرد عند الدرجة 1±4 م°

العينات	مدة الحفظ (يوم)				
	0	3	7	10	15
الشاهد	5,83±0.04^{a}	5,98±0,02^{a}	6,74±0,05^{a}	6,95±0,04^{a}	7,25±0,02^{a}
مستخلص الحبة السوداء	5,13±0,02^{b}	5,21±0,04^{b}	5,91±0,08^{b}	6,22±0,02^{b}	6,54±0,05^{b}
مستخلص السماق	5,48±0,03^{bc}	5,52±0,03^{bc}	6,08±0,07^{bc}	6,41±0,04^{bc}	6,68±0,04^{bc}
مستخلص الفلفل الأسود	5,63±0.03^{bc}	5,70±0,09^{bc}	6,14±0,02^{bc}	6,66±0,05^{bc}	6,90±0,03^{bc}

يشير الاختلاف في الاحرف ضمن العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية (P<0,05)



	0	3	7	10	15
الشاهد	5.83	5.98	6.74	6.95	7.25
الحبة السوداء	5.13	5.21	5.91	6.22	6.54
السماق	5.48	5.52	6.08	6.41	6.68
الفلفل الأسود	5.63	5.7	6.14	6.66	6.9

شكل رقم (5): تغيرات الجودة الكيميائية للحوم الأسماك المدروسة المعاملة بالمستخلصات الزيتية

أشار (**Dainty *and* Mackey,1995**) أن الميكروفلورا الأساسية التي توجد على سطح اللحم بعد عملية الذبح والتحضير تتمثل بالجراثيم المحبة للحرارة المتوسطة التي يتراوح عددها بين 4 – 2 Log CFU/g . وهذا يتفق مع ما توصلنا إليه من تعداد جراثيم الزوائف في أسماك الترويت كانت ضمن هذا الحد في اليوم رقم (0) من الحفظ. إن عملية تخزين الأسماك لفترات طويلة على درجات حرارة بحدود (+4) مئوية داخل البرادات أدى إلى فساد تلك الأسماك بالجراثيم وحدوث أكسدة وتزنخ في الدهون الموجودة فيها وهي مسؤولة عن التغيرات غير المرغوبة في طعمها ولونها ورائحتها (**Sikorski, 1990**) وهذا توافق مع ما توصلنا إليه من ظهور الروائح النشادرية والروائح الكبريتية من لحوم سمك الترويت بعد اسبوع من الحفظ بدرجة حرارة البراد +4م°.

نصت المواصفات القياسية العالمية على أنه يجب ألا يزيد العدد الكلي للجراثيم في لحم السمك عن 5×10^5 في الغرام الواحد وهذا يتوافق مع ما وجدناه في عينات التجربة في بداية الحفظ حيث كان التعداد العام الجرثومي دون الرقم المنصوص عليه وفق المواصفات القياسية العالمية. ولكن لوحظ تزايد التعداد العام الجرثومي مع ازياد مدد التخزين وهذا يتفق مع (**Del Rio *et al.*,2007**) الذي قال أن التعداد العام الجرثومي يزداد في لحوم الأسماك المخزنة بجو التبريد خلال أسبوع من الحفظ ليصل إلى رقم الفساد.

تتمثل الجراثيم التي تنمو على سطح لحم السمك في الظروف الهوائية المبردة والتي تسبب الفساد السريع بجراثيم الزوائف (**Ercolini *et al.*,2007,2010a**) وقد تم عزل هذا النوع من الجراثيم في لحم سمك الترويت بنسبة 88% وقد كانت الزائفة فلورسنس هي المسيطرة على بقية أنواع الزوائف المعزولة لدينا . وهذا يتفق مع ما توصل إليه الباحث (**Bruckner *et al*,2012**) حيث قال أن نوع الزائفة فلورسنس *P.fluorescens* هي المسيطرة على بقية أنواع البسيدوموناس في اللحوم الطازجة في بداية الحفظ. ويخالف ما توصل إليه الباحثان (**Doulgeraki *and* Nychas.,2013**) حيث وجدا أن نوع الزائفة بوتيدا *P.putida* هو المسيطر على بقية أنواع الزوائف حيث قالا أن

الزائفة بوتيدا شكلت نسبة (90%) من المجموع العام للزوائف إلى جانب نوع الزائفة فلورسنس *P.fluorescens* التي احتلت المرتبة الثانية دون التطرق إلى الزائفة اريجينوزا التي تم عزلها في هذا البحث.

إن إضافة المستخلصات الزيتية لنبات الحبة السوداء والسماق والفلفل الأسود قد خفض وبفارق معنوي التعداد العام للجراثيم وتعداد الزوائف وهذا يتفق مع ما قاله (**Prabuseenivasan *et al.*,2006**) بأن المستخلصات الزيتية للنباتات العطرية لها تأثير مضاد على النمو الجرثومي.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1 – يعتبر مستوى تلوث لحوم سمك الترويت بجراثيم الزوائف مرتفعاً حيث بلغ قيمة 88%.

2– تأثرت جراثيم الزوائف من نوع الزائفة الزنجارية والزائفة المتألقة والزائفة بوتيدا بالمستخلصات الزيتية الثلاثة من خلال أقطار منع النمو التي بلغت ما بين 15 – 22 ملم.

3– حققت المستخلصات الزيتية قدرة تثبيطية فعالة على الجراثيم بشكل عام خلال السبعة أيام الأولى مع المحافظة على جودة لحوم الترويت الحسية والفيزيائية .

4– حقق مستخلص الحبة السوداء أفضل تثبيط على جراثيم الزوائف تلاه السماق ثم الفلفل الأسود.

التوصيات:

1 – استخدام المستخلص الزيتي لنبات الحبة السوداء من أجل زيادة مدة حفظ لحم سمك الترويت مدة تزيد عن 10 أيام خلال الحفظ بالتبريد على الدرجة +4 °م.

2– التوسع في الدراسة بحيث تتناول الجراثيم المسببة لفساد لحوم الترويت في البرادات لتشمل جراثيم حمض اللبن وبعض أنواع الإمعائيات وغيرها .

3– التوسع في استخدام النباتات العطرية لما لها من تأثير فعال كمضاد لجراثيم الفساد في لحوم الأسماك ولتوافقها مع الذوق الشعبي العام.

4– اجراء الدراسة على لحوم الأسماك البحرية خاصة الكمبري والبلميدا والتي تسبب تسممات واسعة نظراً لكثرتها في فصل الصيف.

المراجع:

1. AMSA, American Medical Student Association. 1995.
2. APHA, American Public Health Association. 1992.
3. AOAC, Association Of Official Analysis Chemists. 1984.
4. BASTON, O. TOFAN, I. *Refrigerated chicken freshness Correlation between easily hydrolysable nitrogen pH value and biogenic amine contents, The Annals of the University Dunarea de jos of Galati Fascicle*, Vol- 6, 2008:37-43.
5. BRUCKNER, S. ALBRECHT, A. PETERSEN, B. KREYENSCHMIDT, J. *Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry,* Food Qual Vol-35, 2012: 372-382.
6. CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, U.S.A. 2013.

7. CHEVALLIER, A. "*The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley puplishers*", London, 1996: P. 237.

8. COWAN, M. STEEL, S. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambrideg Unversity,1974:400p.

9. COWX, I.G. *Cultured aquatic species information program. Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).* Fisheries and aquaculture department (FAO). 2005 : Rome. [online] http://www.fao.org//fishery/culturedspecies/*Oncorhynchusmykiss/en available:* 15 June, 2013.

10. DAINTY, RH. MACKEY, BM. *The Relationship between the Phenotypic Properties of Bacteria from Chill-Stored Meat and Spoilage Processes*, J. Appl. Bact, Vol-73, 1995: 103-114.

11. DEL RIO, E. PANIZO-MORAN, M. INTERN, J. *Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry*, Food Microbiology, Vol-115, 2007: 286-280.

12. DOULGERAKI, AI. NYCHAS, GJE. *Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods*, Food Microboiology, Vol- 34, 2013: 62-69.

13. DUKE, JA. JOBOGENSCHUTZ-GODWIN, M. DU CELLIERD, J. DU KE, P-AK. *CRC Handbook of Medical Plant CRC press*, Boca Raton, 2003: 269-270.

14. Desmukh, S.D. and Borle, M.N. **1975,** *Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products*. Indian. J. Enth. Pharm. 37(1): 11-18.

15. ERCOLINI, D. CASABURI, A. NASI, A. FERROCINO, I. DI MONACO, R. FERRANTI, P. MAURIELLO, G. VILLANI, F. *Different molecular types of Pseudomonas fragi have the overall behavior as meat spoilers.* International Journal of Food Microbiology,Vol 142, (2010a). 120–131.

16. ERCOLINI, DF. RUSSO, G. BLAIOTTA, O. PEPE, G. Villani, F. *Simultaneous detection of Pseudomonas fragi, P. lundensis, and P.putida from meat by a multiplex PCR assay targeting the carA gene,* Appl Environ Microbiology, Vol- 73, 2007: 2354–2359.

17. FAO :FAO Fishery Information ,Data and Statistics Unit , Aquaculture Production 2003 . In: Fishery Statistics , vol .96/2.FAO yearbook ,Rome , 2005: 195 pp.

18. FAO: Simple Methods for Aquaculture .Manuals from the FAO training series , (English ,French ,Spanish).2007: ISBN 9789250056128.

19. HARRIS, W. S. *Fish oil supplementation evidence for health benefits Cleveland Clinic*. journal of Medicine, vol. 71 , No. 3 ,2004: 221-226p.

20. HOLT, G. KRIEG, R. SNEATH, H. STALEY, T. WILLIAMS, T. *Bergeys manual of determinative bacteriology*.9th.ed.Williams & Wilking,U.S.A, 1994: 418p.

21. HOSSEINZADEH, H. BAZZAZ, F. HAGHI, M. "*Antibacterial Activity of Total Extracts and Essential oil of Nigella Sativa"* L. Seeds in Mice. Pharmacolgyonline 2: 2007: 429-435p.

22. KISKA, L. GILLIGAN, H. *Pseudomonase In Manual of clinical microbiology*.Murray, 2003:350p.

23. KENAWI, MA. ABDEL, HA. *Influence of potassium sorbate and sodium lactate in combination with modified atmosphere packaging on stability of refrigerated chicken breast muscle,* Biotechnol Husbandry, Vol- 21, 2005: 337-347p.

24. KIRK, R. SAWYER, R. *Pearson's composition and analysis of foods*, 9th ed. Longman Scientific and Technical . U.S.A. 1991.

25. LENNETTE, E. BALOWS, A. HAUSLER, W. SHADAMY, J. *Manual of clinical microbiology*, American Society for microbiology, Washington,Vol-4, 1985: 80-100p.

26. MACFADDIN, JF. *Biochemical test for identification of medical bacteria* , London, 2000: 566p.

27. MILES, RS. AMYES, SG. *Laboratory control of antimicrobial therapy*, Practical Medical Microbiology, Vol-4, 1996:151-178.

28. NIERENTZ , J. *Overview of production and trade – the role of aquaculture fish supply* . In :Arthur ,R, Nierentz ,J. Global Trade Conference on Aquaculture Proceedings of the Conference Held in Qingdao , China , 29 -31 May , 2007 . FAO Fisheries Proceedings nc9 ,Rome.2007.

29. NIMRIL, LF. MEQDAM, MM. AL KOFAHI, A. *Antibacterial Activity of Jordanion Medicinal plants.* Pharmaceutical Biology,Vol 37: 1999: 196-201.

30. PEELER, E.J. *The role of risk analysis and epidemiology in the development of biosecurity in aquaculture*. In: Walker , P.J. ,Lester ,R.G.,Bondad – Reantaso , M.G.(Eds.),Diseases in Asian Aquaculture V . Fish Health Section , Asian Fisheries Society , Manila ,Philippines ,Queensland ,Australia , 2005:35-46pp.

31. PRABUSEENIVASAN, S. JAYAKUMAR, M. IGNACIMUTHU, S. *In vitro antibacterial activity of some plant essential oils BMC*, Complementary and Alternative Medicine, Vol- 39, 2006: 1-6p.

32. PUNDIR, R.K. JAIN, P. *Comparative Studies on the Antimicrobial Activity of Black Pepper (Piper Nigrum) and Turmeric(Curcuma Longa) Extracts* International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology . 1, 2010: 492-501p.

33. QUINN, PJ. CARTER, ME. MARKEY, B. CARTER, GR. *Clinical veterinary microbiology*, Vol-3, 1999: 95-102.

34. SIKORSKI, ZE. Seafood: *Resources, nutritional composition and preservation. Boca Raton, Fla.: CRC* press Inc. 1990: 248p.

35. SOTELO, A. PEREZ, L. *Nutritive value of chicken and potato mixtures for infant and preschool children feeding.* J. Sci. Food. Agric. 83: 2003: 1205-1209.

36. VIGNOLO, GM. SURIANI, F. HOLGADO, AP. OLIVER, G. *Antibacterial activity of lactobacillus strains Isolated from dry fermented sausages*, App Bac, Vol- 75, 1993: 344-349p.

37. WATANABE, K. *Lipid nutrition in fish*. Comp. Biochem. Physiol.73B,1982: 3-15.

38. WOYNAROVICH, A. HOITSY, G. POULSEN, M.T. *Small-scale rainbow trout farming.* -Fisheries and aquaculture technical paper. Volume 561, Rome. 2011: 81 pages.