تعيين النشاط المضاد للتأكسد للمستخلصات المختلفة من نبات الفاغر المسكي وتقييم الفعالية البيولوجية لزيته على بعض العوامل الممرضة المعزولة من اللحوم الحمراء المحلية.

د.زينب الحلواني كلية العلوم

الملخص: أظهرت النتائج أن مردود الزيت العطري لنبات الفاغر المسكي *Lamium moschatum* قد بلغ 0,01 %، كما تبين وجود ستة أنواع من الأجناس الجرثومية (السلمونيلة *Salmonella*، والإشريكية القولونية *Escherichia coli*، والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، والكلبسيلة *Klebsiella*، والشيغلة *Shigella*). بالإضافة إلى خمائر المبيضات البيض *Candida albicans* عند اختبار اللحوم الحمراء ميكروبيولوجياً. كما بلغ تركيز الغلوكوز في الأوراق الطازجة للفاغر المسكي من خلال الإسقاط على منحني السلسلة المعيارية للغلوكوز معلوم التراكيز(25-50-75-100 PPM)، 56.96 مغ/غ، أما بالنسبة لتركيز البروتين في أوراق النبات من خلال الإسقاط على منحني السلسلة المعيارية لبروتين الكازئين بلغ (.22) مغ/غ، كما تبين باختبار DPPH تفوق النسبة التثبيطية للنبات المدروس على محلول الفيتامين C ذي التركيز 0.01 مغ /غ حيث بلغت أعلى نسبة في المستخلص المائي (73,58%). أظهرت النتائج فعالية زيت الفاغر المسكي بتراكيز(0.5–1–2–4)% على الأحياء الدقيقة المختبرة حيث بدت حساسية الكلبسيلة عالية لزيت الفاغر مقارنة بالسلالات الجرثومية الأخرى كالزائفة الزنجارية والعنقوديات الذهبية، حيث بلغ قطر هالة التثبيط 20 مم، كما بلغ قطر هالة التثبيط 14 مم عند كل من الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* والمبيضات البيض*Candida albicans* ، كما أبدت السالمونيلة *Salmonella* والشيغلة*Shigella* والإشريكية القولونية *Escherichia coli* مقاومة لزيت الفاغر المسكي بتركيزي % (1 – 0.5).

الكلمات المفتاحية: الفاغر المسكي، المستخلصات النباتية، الزيت النباتي، اللحوم الحمراء، العوامل الممرضة المعزولة.

Determining the antioxidant activity of different extracts from *Lamium moschatum* and Evaluation of the Bioactivities of its oil on some pathogens isolated from local fresh Red meat.

Abstract

The results showed that the yield of essential oil of the (*Lamium moschatum*) reached 0.01%, and the presence of six types of bacterial genera was also shown (*Salmonella, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella, and Shigella*). In addition to Candida albicans yeasts, the red meat was tested microbiologically. The glucose concentration in fresh leaves of Lamium, as projected onto the standard series glucose curve (25, 50, 75, and 100 ppm), was 56.96 mg/g. The protein concentration in the plant leaves, as projected onto the standard series casein protein curve, was 2.2 mg/g. The DPPH test showed that the inhibitory percentage of the studied plant was higher than that of a 0.01 mg/g vitamin C solution, with the highest percentage (73.58%) in the aqueous extract. The results demonstrated the effectiveness of *Lamium moschatum* oil at concentrations of 0.5%, 1%, 2%, and 4% against the tested microorganisms. *Klebsiella* showed high sensitivity to *Lamium moschatum* oil compared to other bacterial strains such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, with an inhibitory aura diameter of 20 mm. 14 mm for both *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans. Salmonella, Shigella* and *Escherichia coli* also showed resistance to *Lamium* oil at concentrations of % (0.5 - 1).

Keywords*: Lamium moschatum*, Plant extracts، Plant oil, red meat, Isolated pathogens.

المقدمة

ينتمي نبات الفاغر المسكي *Lamium moschatum* إلى الفصيلة الشفوية *Lamiaceae*، ورتبة الشفويات *Lamiales* نبات عشبي يضم نحو40 نوعاً، يوجد في المناطق المعتدلة وشبه الاستوائية في أفريقيا وآسيا وأوروبا (Ghoneim, *et al*, 2018)، يصل ارتفاعه إلى 60 سم ذو ساق مربعة مجوفة، وأوراق بيضوية مسننة وعناقيد من الأزهار البيضاء مزدوجة الشفة، ويعرف أيضاً باسم القراص الكاذب، ينتشر بجوار الأنهار وفي المناطق الرطبة، ويزهر من شباط حتى أيار، ويستخدم نبات الفاغر في الطب الشعبي كمضاد للتشنج، ومضاد للالتهابات، ومضاد للفيروسات، وتنظيم الإفرازات الدهنية، وكذلك لعلاج ارتفاع ضغط الدم، وغزارة الطمث، وسرطان الدم (Bendiksby *et al* , 2011).

يتميز الفاغر بوجود فئات مختلفة من المكونات الكيميائية، مثل حمض هيدروكسي سيناميك hydroxycinnamic acids، تربينويد terpenoids، سيكوريدويدس secoiridoids، iridoids، فلافونات flavonoids، أنثوسيانات، بيتين betaine (Yordanova *et al*, 2014). ويرتبط معظم النشاطات الحيوية لأنواع الفاغر بمكوناتها الرئيسة أي الفينولات والزيوت الأساسية (Akkol *et al*, 2008)، وتمثل البوليفينول والفلافونويد والتربينات والمشتقات الستيرويدية العديد من الأنشطة البيولوجية للفاغر (Savchenko *et al*., 2001).

اتجهت الدراسات في السنوات الأخيرة إلى التحري عن التأثير الحيوي للنباتات الطبية على الجراثيم الممرضة، وحصل الباحثون على نتائج واضحة حول تأثير المركبات الفعالة النشطة لهذه النباتات على النمو الجرثومي، وعلى الرغم من إنتاج عدد من المضادات الحيوية الجديدة صناعياً ذات التأثير الفعال في الثلاث العقود الأخيرة، إلا أن الأحياء الدقيقة الممرضة لديها القدرة على مقاومتها بشكل عام وذلك لأن لديها القدرة الوراثية لنقل واكتساب المقاومة للأدوية (Gislene *et al* ., 2000).

لقد أشار الكثير من الباحثين في مجال المضادات الطبيعية للأحياء المجهرية إلى استخدام المستخلصات النباتية لأسباب عديدة منها وفرتها وسهولة الحصول عليها، وقلة كلفتها والأهم من هذا كل هو أنها أكثر أماناً لقلة تأثيراتها الجانبية، وحيث اليوم نعيش صحوة عالمية تتجه نحو الأعشاب

الطبية إذ أثبتت الأبحاث العلمية أن كثيراً من هذه الأعشاب تحتوي مركبات علاجية مهمة وكثيراً ما يصعب أو يستحيل محاكاتها أو تركيبها معملياً. كما تلعب فعالية الزيوت الطيارة في تثبيط نمو الجراثيم العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* مقارنة بجراثيم الإشريكية القولونية *Escherichia coli* التي أوضحت تثبيطاً متوسطاً، وللفينولات دوراً مهماً في تنشيط الأنزيمات المسؤولة عن التفاعلات الأيضية الأساسية وذلك من خلال تفاعلها المتخصص مع البروتينات مما يؤدي إلى تحلل البروتين ومن ثم يؤدي إلى عدم قدرة الجراثيم بالاستمرار في النمو، وتتميز الفلافونويدات بقدرتها على تمزيق أو تفكيك الأغشية الخلوية عن طريق تكوين معقدات مع البروتينات الخارجية الموجودة بالجراثيم، أما فعالية الزيوت فقد عزت الدراسات إلى احتوائها على التربينات التي لها فعالية تثبيطية للجراثيم لأنها تعمل على تمزيق الأغشية الخلوية بواسطة المركبات المحبة للدهون.(Amaral *et al*.,1998)

يُعدّ التسمُّم الغذائي أحد أكثر مسببات المرض والموت في البلدان النامية ويمكن أن يعود ذلك للتلوث بالجراثيم سلبية الغرام، مثل: السَّلمونيلّة التيفيّة *Salmonella typhi* والإشريكيّة القولونيّة *Escherichia coli* والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، والجراثيم إيجابية الغرام، مثل: المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والعصوية الشمعية *Bacillus cereus*.

(Doughari and Pukuma 2007; Pirbalouti *et al*., 2010, Sapkota *et al*., 2012)

يمكن استعمال المواد الكيميائية الحافظة لمنع حدوث فساد المواد الغذائية وتخزينها (Yamamura *et al*., 2000)، ويتطلّب التحكُّم في العوامل الممرضة المنقولة بالأغذية استعمال تقنيات حفظ عديدة عند تصنيع المنتجات الغذائية وتخزينها؛ لذلك هناك حاجة متزايدة لمواد حافظة نشطة يمكنها إطالة العمر الافتراضي للمنتَج الغذائي بتثبيط النمو الجرثومي دون استخدام الملح والسكر التي يميل المستهلك نحو تفضيل النسب المنخفضة منها (Zink, 1997)، إلى جانب الدور السلبي للإضافات الغذائية الصنعية وظهور تأثيراتها الجانبية السلبية في الصحة ما دفع إلى تطوير بدائل طبيعية واستعمال المستخلصات والزيوت النباتية والزيوت كعوامل مضادة للجراثيم والتي هي أكثر أماناً ونشاطاً (Bialonska *et al*., 2010, Tajkarimi *et al*., 2010; Hussain *et al*., 2018)، فللزيوت الأساسية التي تتكون بالكامل من مكونات طبيعية مستخرجة من النبات ولا تحوي على مواد كيميائية صنعية خواص مضادة للجراثيم (Oussalah *et al*., 2007) وللطفيليات

(George *et al*., 2009) وللفيروسات (Astani *et al*., 2011) وللفطريات (Silva *et al*., 2011) ومضادة للأكسدة (Brenes and Roura, 2010)، مع ذلك فاستعمال الزيوت والمستخلصات النباتية كمواد حافظة للأغذية يتطلّب معرفة التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibition Concentration (MIC) لها.

تتعرّض منتَجات اللحوم للأكسدة لاسيما عند التخزين، ويسهّل الفرم تفاعل المؤكسدات مع الحموض الدهنية غير المشبعة وتكوين الجذور الحرة (Ibrahim *et al*., 2010; Yogesh and Ali, 2014)، وهو ما يترك أثراً سيئاً في اللون والنكهة والملمس وجودة الأغذية (Ripoll *et al*., 2011; Trefan *et al*., 2011; Vaithiyanathan *et al*., 2011)، ولحسْن الحظ فإن تطبيق مضادات الأكسدة يمنع أكسدة الدهون (Martinez-Tome *et al*., 2001)، وتستأثر النباتات بأهمية كبيرة كمضافات طبيعية (Zheng and Wang, 2001).

تأتي المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والإشريكية القولونية *Escherichia coli*، في مقدمة مسببات الأخماج الأكثر انتشاراً (Layqa *et al*., 2015; Ali Nizam and Hussain 2016)، فالذهبيّة تسبّب الإصابات الجلدية والتسمم الغذائي والالتهابات الحادة في الدم، والقولونية تسبب التهابات المسالك البولية والأمعاء والقولون، ووفقاً لبيانات معهد Broad (2010) كانت القولونية مسؤولة عن 17.3% وكانت الذهبية مسؤولة عن 18.8% من الإصابات السريرية التي تتطلب دخول المستشفى (Tiemersma *et al*., 2004).

مبررات البحث وأهدافه:

عادة ما يؤثر لون اللحم ورائحته على تقييم المستهلك لجودة اللحوم، حيث تعد أكسدة الدهون مشكلة داخلية رئيسة تؤثر في صفاته لأنها تغير لونه وتخفض من جودته. وبما أن اللحوم الحمراء أحد مصادر البروتين الغذائية الرئيسة إضافة إلى الدهون والأملاح؛ فهي أوساط لنمو مختلف الأحياء الدقيقة التي تؤدي إلى خسائر اقتصادية، إلى جانب الأضرار الناجمة عن التسمم الغذائي الذي تسببه الأحياء الدقيقة نتيجة لإفرازها السموم، مثل: جراثيم السلمونيلة *Salmonella* والإشريكية القولونية *E.coli*والعنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، ومن المؤكد أن فساد اللحوم يبدأ بتأثير كل من الجراثيم وهو مايترك تأثيراً سيئاً في اللون والنكهة والملمس وجودة الأغذية، ولحسْن الحظ فإن تطبيق مضادات الأكسدة يمنع أكسدة الدهون، وتستأثر النباتات بأهمية كبيرة كمضافات طبيعية.

من هنا جاء **هدف البحث** بإيجاد مواد طبيعية مضادة للأكسدة من المستخلصات المختلفة لنبات الفاغر المسكي البري وتحديد الفعالية المضادة لزيته على بعض الجراثيم المعزولة من اللحوم الحمراء بوصفه مادة فعالة حيوياً ويمكن أن تكون بديلة للصادات الحيوية والمواد الكيميائية الصنعية التي تحدث تأثيراً سلبياً في صحة الإنسان.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1. **العينات النباتية** Plant Materials

جُمعت أوراق وأزهار نبات الفاغر المسكي البري (الشكل1) المختار لتنفيذ البحث من قرية قسمين في منطقة النهر الكبير الشمالي أسفل بحيرة 16 تشرين، غربي مجرى النهر على ارتفاع نحو 100 – 170 م عن سطح البحر، على بعد 20 كم شمال شرقي اللاذقية وشمالي طريق حلب في نيسان من العام 2018، ونُقلت العينات إلى المختبر وغسلت بالماء المقطّر المعقّم، ثم جُفّفتْ على أوراق ترشيح بدرجة حرارة المختبر 25 م°.

الشكل (1). النبات المختار للدراسة في البحث: الفاغر المسكي

2. **استخلاص الزيت العطري** Extracting essential oil:

استخلص الزيت العطري من نبات الفاغر بالتقطير بالبخار باستعمال جهاز كلافنجر لمدة ساعتين بوضع 100 gr من العينة النباتية و200 ml ماء حيث يعتمد التقطير المائي على قدرة بخار الماء

حمل الزيت الأساسي وبعد الغليان تحت تأثير منبع حراري يتشبع بخار الماء بالزيت النباتي وبسبب الفرق الموجود بين كثافة الماء المقطر والزيت الأساسي يبقى الزيت طافي ويجمع الزيت في قارورة زجاجية مغلقة بإحكام وتحفظ بعيداً عن الضوء وفي درجة حرارة مابين 4–6 م° (Clevenger,1928).

3. تحضير المستخلصات النباتية Preparation of Plant Extracts

1.3 المستخلصات المائية Aqueous extracts:

وُضعت كمية من الأوراق المجفّفة سابقاً لنبات الفاغر في الحاضنة مدّة ساعتين بدرجة حرارة 37 م° للتخلّص من أي رطوبة في العينة لتسهيل طحن الأوراق (Blazekovic *et al*., 2011). طُحنت الأوراق الجافة بطاحونة كهربائية (Grinder)، وأُخذت كمية 25 غ من المسحوق ونُقعت في حوجلة سعة 500 مل بإضافة 250 مل من الماء المقطر (Khayyat *et al*., 2018) الشكل، وُضعت العينات على الرجّاج في درجة حرارة المختبر 25 °م على سرعة 170 دورة/ د، بعيداً عن الضوء مدّة 48 ساعة. رُشِّح المستخلص باستعمال ورق ترشيح واطمان Watman قطر ثقوبه 0.45 µ، وجُفِّف في حاضنة هوائية لا تتجاوز درجة حرارتها 40 °م (Mahmoudi *et al*., 2014).

2.3 المستخلصات الإتانولية والكلوروفورمية Ethanol and Chlorophormic Extracts

يتم الحصول عليها بنقع كمّية 25 غ من المسحوق النباتي في حوجلة سعة 500 مل بإضافة 250 مل من أحد المذيبات العضوية (الإتانول بتركيز 95% – الكلوروفورم) كلّ على حدا، ووُضعت في الرجّاج على سرعة 125 دورة/ د في درجة حرارة المختبر 25 °م. بعدها رُشِّح المستخلص باستعمال ورق ترشيح واطمان قطر ثقوبه 0.1 µ، ثم جرى استعمال المبخّر الدوار Rotary Evaporator تحت ضغط منخفض للتخلص من المذيب العضوي عند درجة 45 م° (Khayyat *et al*., 2018).

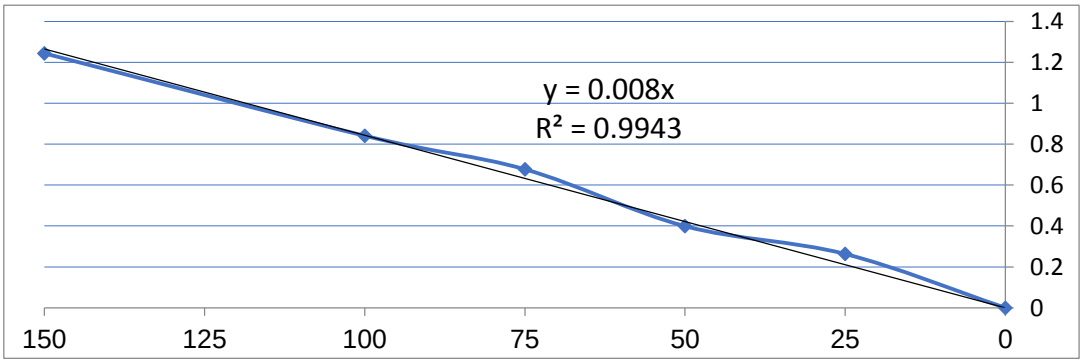
4. تحديد المواد الكيميائية Determination of Chemicals

1.4 تعيين المحتوى الكلي للسكريات Determination of total sugar content:

حيث وضع في كل أنبوب 0,1 غ من الأوراق بعد سحقها وأضيف 5 مل كحول إيتيلي تركيز 60% وثقلت الأنابيب بسرعة 2500 rpm دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق وأخذت الخلاصة وأضيف مرة أخرى كحول إيتيلي وكررت العملية ثلاث مرات، وأخذ المحلول الطافي في كل استخلاص وأكمل إلى 25 مل من الكحول .

أخذ 1 مل من العينة النباتية وأضيف إليها 4 مل من كاشف الأنترون الذي حضر بأخذ 0,2 g وتم حله ب 100 مل من حمض الكبريت المركز .

ووضعت الأنابيب بالحمام المائي عند درجة حرارة 95 °C لمدة 15 دقيقة وبردت بدرجة حرارة الغرفة ثم قيست الامتصاصية على جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 620 nm ولمعرفة تركيز السكريات الذوابة في الكحول حضر منحني معياري من سكر الغلوكوز معلوم التراكيز (25-50-75 - 100) PPM (الشكل2). قُدّرت التراكيز بعدد الميلي غرامات المكافئة للغلوكوز في 1 غ من وزن المستخلص الجاف. أجريت 3 مكررات لكل مستخلص (Andriopoulos *et al.*, 2022).

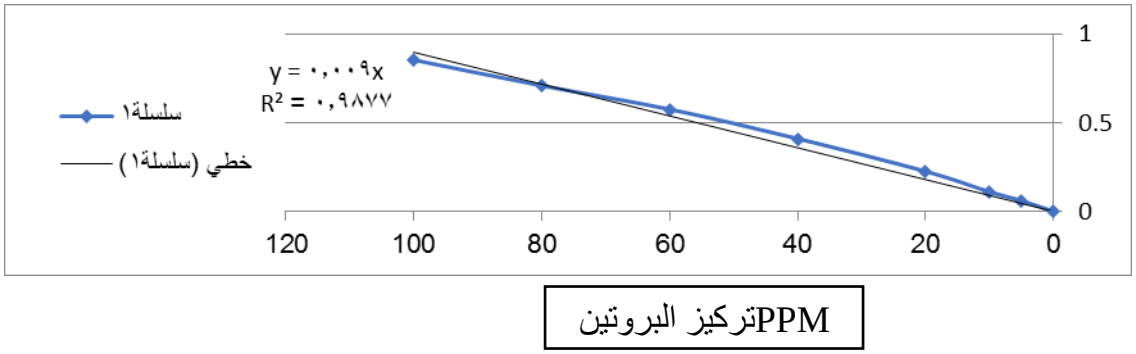


الشكل (2). المنحني العياري لسكر الغلوكوز

24. تعيين المحتوى الكلي للبروتينات Determination of total protein content:

عين المحتوى الكلي للبروتينات اعتماداً على طريقة برادفورد، التي تعتمد على تفاعل صبغة أزرق الكوماسي Coomasie Brilliant blue G-250 مع البروتينات وتشكيل معقد أزرق اللون.

يؤخذ 1 غ من عينات الورق الطازجة المقطعة ويخلط مع Poly vinyle poly pyrrolidine 25% وأربعة أحجام من المحلول الموقي الفوسفاتي (12مل) و0,1 µl من EDTA.
العينة التي تم نقعها تثفل لمدة 20 دقيقة بسرعة 4500 دورة في الدقيقة، يؤخذ 10 µl من العينة النباتية بالإضافة ل 490 µl ماء مقطر و1 مل أزرق الكوماسي .أما الشاهد 1 مل أزرق الكوماسي بالإضافة ل 500 µl ماء مقطر وتوضع العينات ضمن جهاز السبيكتروفوتوميتر وتقاس الإمتصاصية عند طول موجة 595 nm.
وحدد المحتوى الكلي للبروتينات من خلال منحني معياري لمحلول الكازئين في الماء بالتراكيز 0 إلى 120 ppm (الشكل 3)، باستعمال كاشف أزرق الكوماسي الذي يمنح الكترونات للبروتين، حيث يحدث الارتباط بين المجموعات سلبية الشحنة (زمرة سلفونيل) من الكوماسي مع المجموعات إيجابية الشحنة من البروتين، وكنتيجة للارتباط يظهر اللون الأزرق مع العلم أن هذه الروابط هي روابط فاندرفالس (Bradford, 1976).



الشكل (3). السلسلة العيارية لبروتين الكازئين

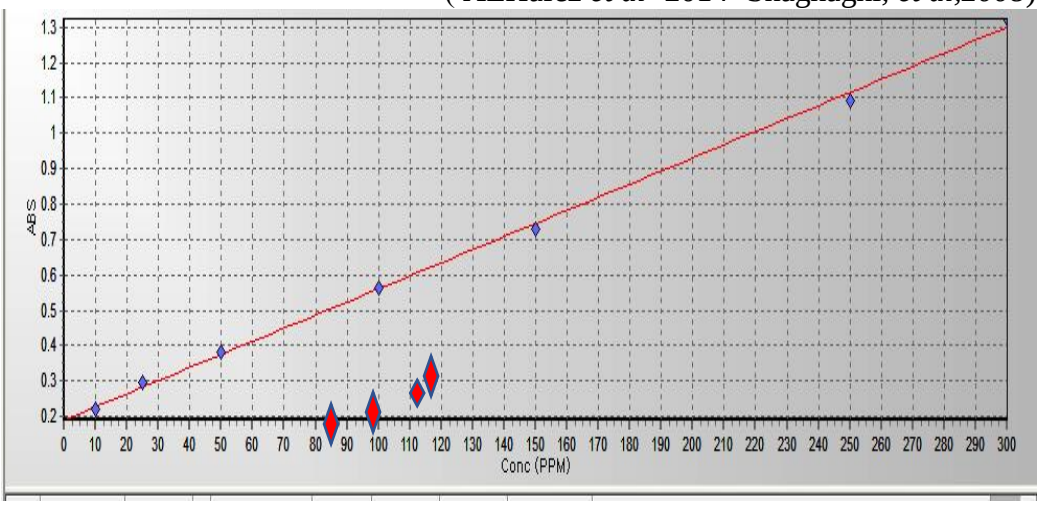
5. تعيين الفينولات الكلية للمستخلصات المائية والإيتانولية والكلوروفورمية لنبات الفاغر المسكي.

تستخدم طريقة فولين لتعيين الفينولات الكلية حيث ترجع الفينولات حمض فوسفو مولبيدات التنغستين في وسط قلوي فينتج عنه محلول أزرق اللون يقاس امتصاصه عند طول موجة 760 nm،

حيث تحدث سلسلة من تفاعلات الإرجاع بانتقال إلكترون أو اثنين من الفينولات تؤدي إلى تشكل معقدات زرقاء اللون تضم الشرسبة ($PMoW_{11}O_{40}$) (Singleton,1999).

حيث تم وضع 1000 µl من العينة الممددة بالإيتانول 70% مع 4,8 ml ماء منزوع الشوارد و 4 ml كربونات الصوديوم اللامائية (2% w/v) للمستخلصات المائية والإيتانولية و DMSO للمستخلصات الكلوروفورمية و 200 µl من كاشف فولين – سيوكالتو، مزجت جيداً ثم تركت في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة قيست الإمتصاصية عند 760 نانومتر مع عينة شاهدة وعينت الفينولات الكلية بدلالة منحني عياري خطي لحمض الغاليك في الإيتانول 70 % بعدة تراكيز 125 mg/l –0 وقدرت النتائج بمكافئات من حمض الغاليك ل 1 g لمسحوق النبات الجاف (الشكل 4) .

(ALHafez *et al* ،2014؛ Shaghaghi, *et al,2008*)

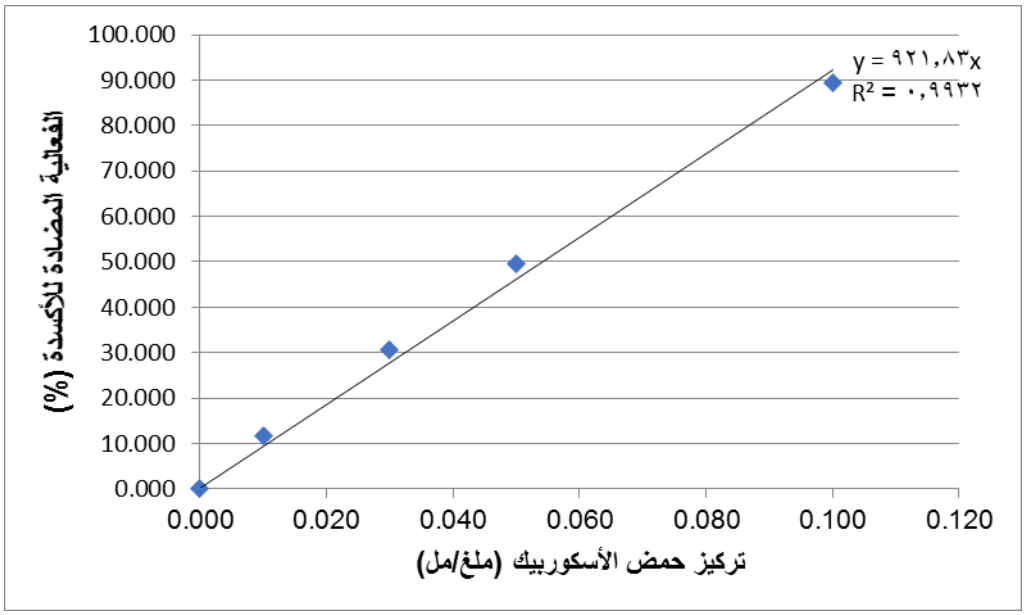


الشكل (4). المنحني العياري لحمض الغاليك لتعيين الفينولات الكلية.

6. تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة لمستخلصات نبات الفاغر المسكي.

حيث يعد هذا الاختبار من أهم وأكثر الاختبارات استخداماً ويستخدم في تحديد قدرة مضادات التأكسد على تثبيط الجذور الحرة وتتم بوساطة جذر حر وثابت له لون بنفسجي في الحالة المعتدلة، ويعد تناقص قيم الامتصاصية للمزيج التفاعلي عند طول موجة 515 nm دليلاً على تزايد قدرة العينة على كبح الجذور الحرة.

أخذ 100 µl خلاصات مائية و إتانولية و كلوروفورمية للنبات بتركيز 1%، وأضيف إليها 1 مل من DPPH، أما الشاهد فيؤخذ 100 µl من الماء المقطر، وأضيف إليه 1 مل من DPPH، وقيست الامتصاصية عند طول موجة 515 nm، وكان تعيين DPPH بدلالة منحني عياري لحمض الأسكوربيك (Azaat *et al.*, 2022). درست النتائج بالمقارنة مع الفيتامين C (حمض الأسكوربيك) (الشكل5).



الشكل (5). السلسة العيارية لحمض الأسكوربيك

7. عزل الأحياء الدقيقة الممرضة Isolation of Pathogens

عُزلت الأحياء الدقيقة الممرضة من عيّنات اللحوم، بأخذ 10 عينات من لحم ذكر الغنم و10 عينات من لحم ذكر العجل من منطقة الفخذ في السوق المحلية في مدينتي دمشق وحمص من

سورية، حيث وضعت في عبوات زجاجية محكمة الإغلاق معقمة مسبقاً ونقلت إلى المخبر وتم التخزين المبرد لحين إجراء التحاليل ولمدة لم تزد عن 24 ساعة، واستُعملت الأوساط الصلبة الانتقائية للجراثيم. واستُعملت مجموعة من الأوساط الصلبة الانتقائية للجراثيم، مثل: وسط إيوزين زرقة المِثلين EMB Agar لتنمية الأمعائيات، وسط شابمان آغار Chapman Agar لتنمية العنقوديات، وسط سيترامايد آغار Cetramide Agar لعزل الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* القادرة على تحرير الأمونيا، وسط دكستروز البطاطا آغار Potato Dextrose Agar PDA لتنمية خمائر المبيضات البيض *Candida albicans*، إضافة إلى وسط الآغار المغذي والمرق المغذي (APHA, 2000). تم تحديد هوية الجراثيم المعزولة من العينات بعد إجراء الاختبارات الحيوية الكيميائية اللازمة (الأُكسيداز، الكَتالاز، الإندول، أحمر المِتيل، تخمير السُّترات، فوجس بروسكاور، تحرير H_2S) اعتماداً على دليل بيرجي (Garrity *et al*., 2005).

اختُبرت حساسية الجراثيم المعزولة ومقاومتها بطريقة الانتشار القرصي، وحُدّدت الحساسية والمقاومة لبعض الصادات الحيوية بقياس هالات التثبيط على وسط مولر هنتون آغار Mueller Hinton Agar (Barker and Kehoe 1995)، واستُعملت مجموعة من الصادات الحيوية (الجدول 1) مع تحديد تركيزها في الأقراص.

الجدول1: الصادات الحيوية المستعملة، mcg.

Antibiotic	Code	Antibiotic	Code
Ampicillin/ Cioxacillin	APX: 25/5	Cefaclor	CEC: 30
Tobramycin	TOB: 10	Lincomycin	L:2
Erythromycin	E:15	Pipemidic	PI:20

8. **تحضير اللقاح الجرثومي** Preparation of bacterial Inoculum

أُجريت عملية تنمية الجراثيم المعزولة من اللحوم على وسط الآغار المغذي Nutrient Agar NA وحضنها في الدرجة 37 °م مدة 24 ساعة، ثم أُخذ جزء من مستعمرة بواسطة اللاقحة الجرثومية من كل نوع من الجراثيم، في ظروف عقيمة، إلى أنبوبة اختبار تحتوي 5 مل من المرق المغذي

Nutrient Broth، وحُضنت في درجة حرارة 37 °م مدة 4 ساعات، ثم أُجريت التمديدات المناسبة لكل نوع من الجراثيم بحيث يكون العدد الكلي للخلايا بحدود 1.5×10^8 خلية/مل والذي يكافئ هذا العدد 0,5McFarland (Anandi and Juan 2009).

9. **اختبار فعالية الزيت النباتي** Test Bioactivity of Plant oil

نُقل 0.5 مل من المعلق الجرثومي وفرش فوق وسط الاستزراع بماسحة قطنية على وسط مولر هنتون، بعد 15 دقيقة وُزِّعت الزيوت العطرية بتركيز (4-2-1-0,5) %، في حفر ضمن الآغار ووضع في كل حفرة 80 µl من الزيت ووُضعت الأطباق في البراد مدة ساعتين لانتشار المادة النشطة ضمن الوسط ، ثم حُضنت في الدرجة 37 °م مدة 24 ساعة، إن ظهور هالات التثبيط inhibition zones على الآغار دليل على تثبيط النمو الجرثومي، وقُيست أقطار هالات التثبيط بعد انتهاء عملية الحضن باستعمال أداة قياس دقيقة أو مسطرة مليمترية، أُجريت التجربة بواقع ثلاثة مكررات (Kelmanson, *et al.*, 2000).

النتائج والمناقشة Results and Discussion:

1. **مردود الزيت العطري لنبات الفاغر المسكي** ***Lamium moschatum***

بلغت نسبة مردود الزيت لنبات الفاغر المسكي 0,01 %، وهذا ما يتوافق مع نتائج الباحثين الذين أشاروا إلى أن نسبة مردود الزيت تتراوح بين 0.31 -0.01 % (Salehi *et al.*, 2019). تعزى الاختلافات في مردود الزيوت العطرية لعوامل عدة منها العوامل المناخية والجغرافية، كما تعود هذه الاختلافات أيضاً إلى طريقة استخلاص الزيت العطري ومدة الاستخلاص (Sørensen and Katsiotis, 2000)

2. **المحتوى الكلي للسكريات** Total sugar content

يفيد تعيين المحتوى الكلي من السكريات في تقدير القيمة الغذائية وكذلك العلفية للنبات، ومن المعروف أن السكريات من أهم المغذيات كونها مصدراً هاما للطاقة، حيث بلغ تركيز الغلوكوز في الأوراق الطازجة للفاغر المسكي من خلال الإسقاط على منحني السلسلة المعيارية للغلوكوز معلوم التراكيز (25-50-75-100 PPM)، 56.96 مغ/غ.

3. **المحتوى الكلي للبروتينات** Total protein content

بلغ تركيز البروتين في أوراق النبات من خلال الإسقاط على منحني السلسلة المعيارية لبروتين الكازائين (.22) مغ/غ .

4. تعيين النشاط المضاد للتأكسد للمستخلصات المختلفة للنبات المدروس

Determination of antioxidant activity of different extracts of the studied plant

- تعيين الفينولات الكلية Total Phenols (TP)
- تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة

1.4 يوضح الجدول 2 نتائج قيم الفينولات الكلية TP للمستخلصات المائية والإتانولية والكلوروفورمية للنبات المدروس.

الجدول2. محتوى الفينولات الكلية في المستخلصات المائية والإتانولية والكلوروفورمية للنبات المدروس.

النبات	المحتوى الكلي للفينولات mg/g للمستخلصات		
	المائية	الإتانولية	الكلوروفورمية
Lamium moschatum	51,46 ±1,3	52.77 ± 1.8	10.51 ± 0.58

2.4 تعيين القدرة على كنس الجذور الحرة للمستخلصات النباتية

Determination of free radical scavenging capacity of plant extracts

أجري اختبار DPPH لتعيين قدرة المستخلصات المائية والإتانولية والكلوروفورمية للنبات المدروس على كنس الجذور الحرة، وحسبت نسب الكنس وقورنت النتائج بالنسب التثبيطية لفيتامين C المعروف باستعماله كمادة مرجعية لقدرته التثبيطية المرتفعة (Saha *et al.*, 2008)، وأدرجت النتائج في الجدول3.

الجدول3. مقارنة فعالية المستخلصات المختلفة المضادة للتأكسد *Lamium moschatum* مع فيتامين C .

Lamium moschatum	المائية	الإتانولية	الكلوروفورمية
	73,58 ± 3	9.4 ± 1.1	35.33 ± 0.2

فيتامين C	11.69 % بتركيز 0.01 mg /ml

أبدى جميع المستخلصات قدرة تثبيطية جيدة، وبمقارنة القدرة على تثبيط جذر DPPH بين جميع المستخلصات والفيتامين C يتبين تفوق النسبة التثبيطية للنبات المدروس على محلول الفيتامين C ذي التركيز 0.01 مغ /غ، كما أن المستخلص المائي لنبات الفاغر المسكي كان الأعلى فاعلية في تثبيط جذر DPPH، وهذا ما يتوافق مع نتائج بحث بوبينو (Bubueanu,C *et al.,* 2013).

5. الأحياء الدقيقة المعزولة من اللحوم.

يبين الجدول4 الأنواع والأجناس الجرثومية الستة التي تم عزلها عند اختبار اللحوم الحمراء ميكروبيولوجياً بالإضافة إلى خمائر المبيضات البيض *Candida albicans*، إذ عُزلت من عينات لحوم الأغنام والعجل المحلية الأجناس والأنواع الآتية: السلمونيلة *Salmonella*، والإشريكية القولونية *Escherichia coli*، والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، والكلبسيلة *Klebsiella*، والشيغلة *Shigella*.

الجدول 4. الأحياء الدقيقة المعزولة من اللحوم الحمراء من أسواق دمشق وحمص.

أنواع وأجناس الأحياء الدقيقة المعزولة المختبرة	عدد العينات الإيجابية في اللحم %	
	لحم غنم	لحم عجل
E. coli	85.71	66.66
Pseudomonas aeruginosa	57.14	33.33
Klebsiella sp.	42.85	16.66
Shigella sp.	28.57	50.00
Salmonella sp.	42.85	33.33
Staphylococcus aureus	14.28	66.66

16.66	28.57	*Candida albicans*

6 .**نتائج تحديد هوية العزلات:**

1.6 تحديد هوية العزلات تبعاً للخصائص المزرعية:

يظهر (الجدول5) والصور اللاحقة الخصائص الزرعية للنموات الجرثومية على المستنبتات النوعية والإنتقائية، إذ تم تحديد هويتها مبدئياً تبعاً لهذه الخصائص وبذلك تم عزل 6 مجاميع جرثومية صنفت كالإشريكية قولونية *E.coli* والزائفة الزنجارية *P. aeruginosa* والعنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* والسلمونيلة *Salmonella* والكلبسيلة *Klebsiella* والشيغلة *Shigella* بالإضافة إلى خمائر المبيضات البيض *Candida albicans* حيث بدت مستعمرات دائرية ذات حواف ناعمة أو متموجة أحياناً وقوام كريمي طري وذات رائحة شبيهة برائحة الخميرة .

الجدول 5. نتائج زرع العزلات تبعاً للخصائص اللونية على الأوساط الزرعية

عزلات	E.coli	*P.aeruginosa*	*S.Aureus*	*salmonella*	*Shigella* sp.	*Klebsiella*
NA	م. رمادية	أخضر متفلور	م. صفراء	م. رمادية	–	—
McC	م. زهرية	شاحبة اللون	يمنع النمو	دون لون	م. صغيرة وردية	م. وردية مخاطية

SS	م. زهرية	ـــــ	يمنع النمو	م.عاتمة المركز	عديمة اللون	ـــ
EMB	م. لامعة	م.غير منتظمة	عديمة اللون	م. مسودة في المركز	كبيرة عديمة اللون	م.كبيرة وردية مع مركز أزرق
Chapman	ـــــ	ـــــ	صغيرة باهتة صفراء وغير محاطة بهالة	ـــــ	ـــــ	ـــ
Baird parker	ـــ	ـــــ	م.كبيرة سوداء محاطة بهالة شفافة	ـــــ	ـــــ	ـــــ
Mannitol	ـــ	ـــــ	م. صفراء كبيرة	ـــــ	ـــــ	ـــــ
CA	–	م. تعطي الصبغة الخضراء	ـــــ	ـــــ	ـــــ	ـــــ

م: مستعمرات ، – : عدم نمو ، **NA**:Nutrient Agar ، **McC**: MacConkey Agar،
SS: SS Agar ،**CA**: Cetramid Agar

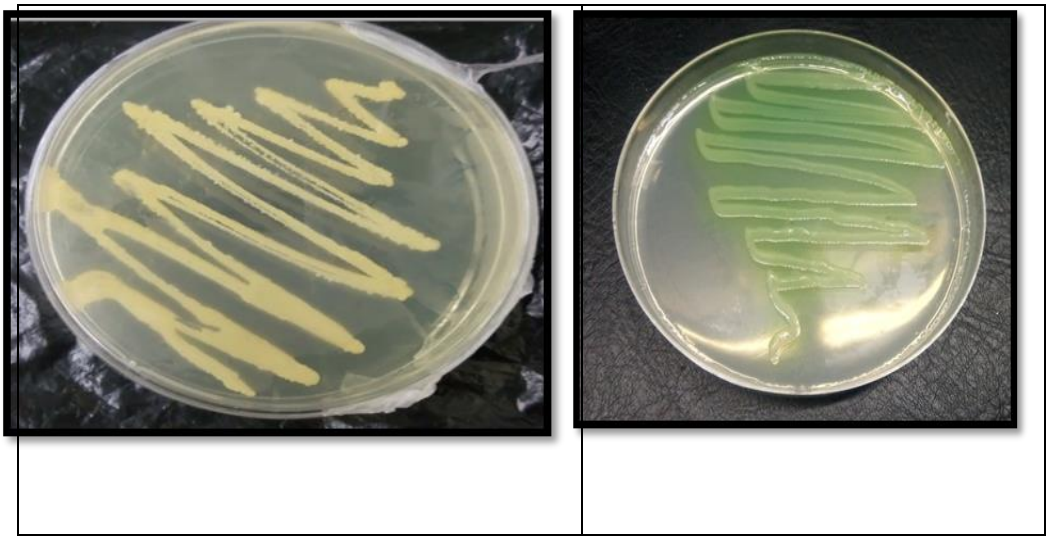
شخصت جميع العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات النامية حيث ظهرت *P. aeruginosa* على وسط آغار الماكونكي شاحبة عديمة اللون لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط الزرعي ولها رائحة شبيهة بالعنب المتخمر بينما ظهرت مستعمراتها بلون أخضر متفلور على وسط الآغار المغذي Nutrient Agar ، في حين ظهرت بلون أخضر لامع على وسط سيترميد آغار Cetramid Agar حيث أن *P. aeruginosa* تنتج عدداً من مخالب الحديد القابلة للذوبان في الماء بما في ذلك بيوفيردين pyoverdin الأصفر والأخضر أو البني المصفر، عندما يتحد بيوفيردين مع بيوسيانين القابل للذوبان في الماء الأزرق ، يتم إنشاء خاصية اللون الأخضر اللامع

(Aryal *et al* , 2018) من *Pseudomonas aeruginosa* كما في الشكل (6).

أظهرت نتائج الفحص الزرعي لجراثيم *Staphylococcus aureus* بأن هذه الجراثيم كونت مستعمرات دائرية لماعة غير شفافة ذات لون أصفر ذهبي على وسط الآغار المغذي، كما كانت مخمرة لسكر المانيتول على وسط آغار المانيتول الملحي الشكل (7).

ومستعمرات صغيرة ذات أصباغ باهتة صفراء وغير محاطة بهالة على وسط شابمان آغار Chapman stone Agar الشكل (8).وعلى وسط بيرد بركر Baird-Parker medium مستعمرات سوداء الشكل (9) بسبب انخفاض التيلوريت .

(AL-Sulami *et al* , 2001). .



الشكل 6. *Pseudomonas aeruginosa* معطية الصبغة الخضراء التألقية على وسط cetramid Agar	**الشكل 7. *Staphylococcus aureus* على وسط المانيتول**
الشكل8. . *Staphylococcus aureus* على وسط Chapman	**الشكل9. *Staphylococcus aureus*. على وسط Baird-Parker**

يظهر الشكل (10) نمو مستعمرات *Salmonella* على وسط آغار السلمونيلة الشيغلة SS Agar (شفافة من لون الوسط مع مركز أسود)، أما بالنسبة لمستعمرات *Shigella* لا تخمر اللاكتوز الشكل (13)، ولا تنتج غاز كبريتيد الهيدروجين لذا كانت عديمة اللون (Fung,2008) .

كما أبدت *E.coli* لمعان أخضر معدني على وسط آغار الإيوزين زرقة المتلين EMB الشكل (11) حيث أن الانخفاض السريع للرقم الهيدروجيني للآجار الناتج عن تخمر سكر اللاكتوز هو

العامل الحاسم في تكوين اللمعان ، ومستعمرات حمراء قرمزية على وسط آغار الماكونكي MacConkey Agar.

كما أظهرت نتائج زرع العزلات على وسط آغار الإيوزين زرقة المتلين EMB وجود مستعمرات كبيرة مخاطية وردية إلى إرجوانية بدون لمعان أخضر معدني أنها تعود إلى *Klebsiella* الشكل (12)(Cari Larico and Diaz Quispe ,2017) .

الشكل 10. *Salmonella* على وسط SS Agar

الشكل 11. *E.coli* على وسط EMB

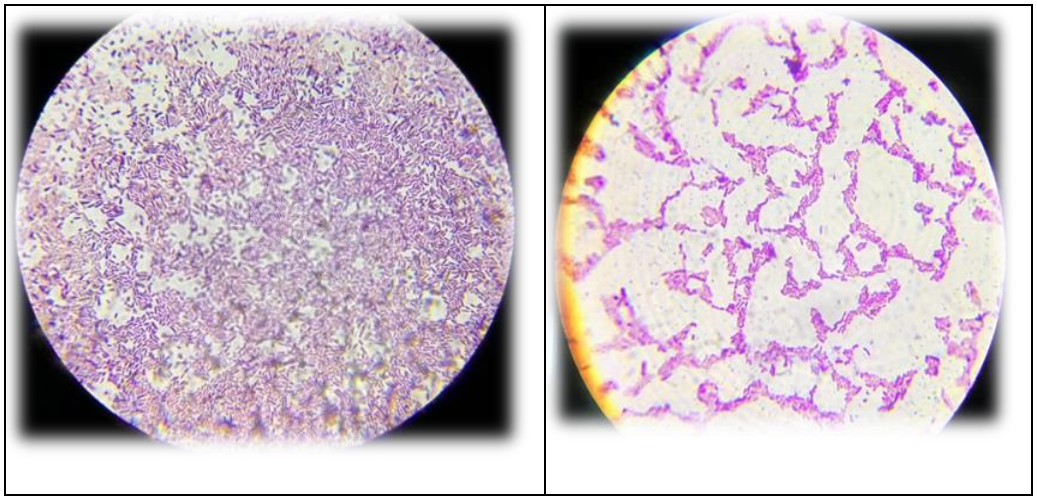
الشكل 12. *Klebsiella* على وسط EMB	**الشكل 13. *Shigella* على وسط SS Agar**

2.6 تحديد الهوية تبعاً للصبغات والفحص المجهري.

بينت نتائج أخذ المسحات الجرثومية للعزلات المختلفة وصبغها بصبغة غرام، ومن ثم فحصها تحت المجهر ومشاهدة الصفات المجهرية الشكل (14) وجود مستعمرات سلبية لصبغة غرام ضمت الإشريكية القولونية والسلمونيلة والزوائف والشيغلة والكلبسيلة، ومستعمرات إيجابية لصبغة غرام ضمت العنقوديات الذهبية واتفقت النتائج مع (Sukhadeo and Trinad ,2009 Adzitey and Huda,2010؛).

الجدول 6. تحديد هوية العزلات تحت المجهر

العزولات	*E.coli*	*P.aeruginosa*	*S. aureus*	*Salmonella*	*shigella*	*Klebsiella*	*candida*
صبغة غرام	–	–	+	–	–	–	+
الفحص المجهري	عصيات مستقيمة أطرافها مدورة، منفردة أو في سلاسل	عصيات رفيعة مستقيمة	مكورات دقيقة مدورة منتظمة عنقودياً	عصيات ثخينة طويلة	عصوية الشكل	عصيات قصيرة	خلايا مستديرة إلى بيضاوية الشكل



E.coli	*shigella*

Klebsiella	*Staphylococcus aureus*

Pseudomonas aeruginosa	*Candida albicans*

الشكل 14. تحديد هوية العزلات الجرثومية تبعاً للفحص المجهري.

3.6 تحديد الهوية تبعاً للتفاعلات الكيميائية الحيوية

تم تحديد هوية الجراثيم المعزولة بإجراء بعض الاختبارات الكيميائية المحددة للأجناس يمكن تلخيصها في (الجدول7) التالي حيث نلاحظ امتلاك جميع العزلات لأنزيم الكتلاز Catalase من خلال تكوين فقاعات غاز O_2 والماء عند تحلل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بينت نتائج الفحوصات الكيميائية سلبية جميع العزلات لاختبار الأكسيداز باستثناء الزائفة الزنجارية التي أعطت نتيجة إيجابية لاختبار أكسيدازOxidase من خلال تكوين اللون البنفسجي عند إضافة المستعمرات إلى ورق ترشيح المشبع بكاشف الأكسيداز، كما لم تتمكن العزلات من إنتاج الأندول من الحمض الأميني التربتوفان لعدم امتلاكها أنزيم التربتوفيناز ،إذ يمكن التحري عن الأندول بإضافة قطرات من كاشف Kovacs reagent فيما عدا الإشريكية القولونية التي أبدت إيجابية لاختبار الأندول (Harley, 2005).

الجدول 7. نتائج تحديد هوية العزلات السلبية والوجبة لملون غرام تبعاً للاختبارات الحيوية الكيميائية

(k) catalase , (O) oxidase , (VP) vogas proskauer ,(I) Indol , (MR)

SAC	*Glu*	*LAC*	*c*	*U*	*MR*	*I*	*VP*	*o*	*K*	
متغير	+	+	_	_	+	+	_	_	+	***E.coli***
_	+	_	_	_	+	_	_	_	+	***Salmonella***
_	-	_	+	_	_	_	_	+	+	***p.aeruginosa***
+	+	+	+	+	+	_	+	_	+	***s.aureus***
_	+	_	_	_	+		_	_	+	***shigella***
+	+	+	+	+	_	_	+	_	+	***Klebsiella***
-	+	-								***candida***

Methyle red , (U) urea (c) simmon citrate , (L) Lactose , (Glu) Glogose , (SAC) sacarose

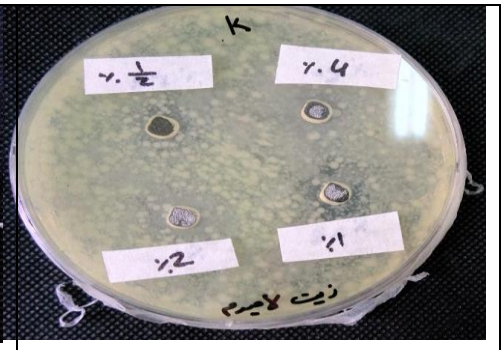
7.النشاط الحيوي لزيت اللاميون (الفاغر) المسكي ضد الجراثيم.

تشير النتائج الموضحة في الجدول 8 إلى فعالية زيت الفاغر المسكي في الجراثيم الممرضة المختبرة إذ بدت حساسية الكلبسيلة عالية لزيت الفاغر مقارنة بالسلالات الجرثومية الأخرى، وبلغ قطر هالة التثبيط 20 مم، وأبدت السلمونيلة والشيغلة والإشريكية القولونية مقاومة لزيت الفاغر المسكي بتركيز 1 - 0.5 %، وهذا ما يتوافق مع نتائج السيد (EL- sayed,2008).

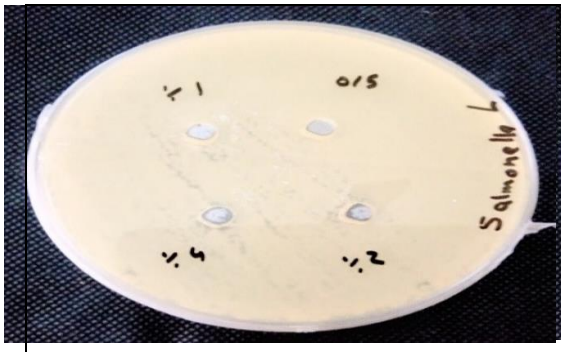
تعود فعالية الزيت للتركيز العالي من التربينات المؤكسجة oxygenated 47.97 % وأكسيد الكاريوفلين caryophyllene oxide 13.84% (EL-sayed, 2008)، كما تشير الدراسات إلى أن الزيت الغني بالتربينات المؤكسجة يظهر نشاطاً مضاداً للجراثيم ضد التهاب البشراوية المكورات العنقودية الجلدية (Köse *et al*, 2007)، وقد أبدى أكسيد الكاريوفلين نشاطاً في المكورات العنقودية الذهبية (Ulubelen *et al.*, 1994)، ويستعمل كمادة حافظة في الأطعمة والأدوية ومستحضرات التجميل (Yang *et al.*, 2000)، وقد كان اختباره كمضاد للفطريات الجلدية (EL-sayed,2008)، يتكون الزيت العطري في أزهار الفاغر يتكون من الميرسين myrcene 47.2% و كاروفيللين caryophyllene 11.8% والسابنين sabinene 11.0% (Flamini *et al*,2005)، وعلى الرغم من وجود تشابه في المكونات لجميع العينات *L. garganicum* و *L. maculatum* التي جُمعت من تسعة تجمعات طبيعية باستعمال GC-MS في بلغاريا (Alipieva *et al*,2003)، فقد لوحظ اختلافات كمية ونوعية في تكوين الزيوت العطرية للنباتات التي أمكن الحصول عليها من مواقع مختلفة في بلغاريا. فقط لوحظ أسيتون سداسي هيدروفارنيسيل في *L. maculatum* في جبل لوسين 1.9% بينما في Ljaskovetz 1.2 %.

الجدول 8. قطر هالة التثبيط للزيت العطري لنبات الفاغر المسكي البرية على الجراثيم المختبرة والمبيضات البيض، (الواحدة مم)

متوسط قطر هالة التثبيط، %				الميكروبات المختبرة
% 4	% 2	% 1	% 0.5	
10 ± 0.0	6 ± 0.5	-	-	***E. coli***
14 ± 0.0	12 ± 1	11± 1	9 ± 0.0	***Pseudomonas aeruginosa***
20 ± 1	14 ± 0	12 ± 0.5	10± 0.0	***Klebsiella***
9 ± 0.5	-	-	-	***Shigella***
-	-	-	-	***Salmonella***
9 ± 2	7 ± 1	-	-	***Staphylococcus . aureus***
14	11	10	9	***Candida albicans***



الشكل15 . تأثير زيت الفاغر المسكي في الكلبسلة *Klebsiella*



الشكل16 . تأثير زيت الفاغر المسكي في السلمونيلة *Salmonella*

الجدول9. نتائج حساسية ومقاومة أنواع العوامل الممرضة المدروسة تجاه الصادات الحيوية، (الواحدة مم).

E	L	PI	TOB	APX	CEC	Abbrev.
15	2	20	10	30	30	Conc.
R	R	6	9	R	R	*E. coli*
R	R	9	13	R	R	*Pseudomonas aeruginosa*
R	R	9	11	R	R	*Klebsiella* sp.
R	R	9	10	R	R	*Shigella* sp.
R	R	8	13	R	R	*Salmonella* sp.
R	R	9	10	R	R	*Staphylococcus aureus*
R	R	9	10	R	R	*Candida albicans*

E: Erythromycin ,L: Lincomycin, PI: Pipemidic, TOB: Tobramycin, APX: Ampicillin/ Cioxacillin, CEC: Cefaclor.

يبين الجدول 9 نتائج حساسية الجراثيم الممرضة المعزولة وكذلك المبيضات البيض ومقاومتها تجاه الصادات الحيوية المستعملة، ويتضح أن جميع الجراثيم الخاضعة للدراسة مقاومة للأمبيسيلين Ampicillin والسيفاكلور Cefaclor واللينكوميسين Lincomycin والإرثروميسين Erythromycin.

أبدت الزائفة الزنجارية سلبية الغرام حساسية جيدة تجاه هذين الصادين التوبراميسين Tobramycin والبيبميديك Pipemidic إذ بلغت أقطار هالة التثبيط 13 و 9 مم على التوالي، كما أبدت المبيضات البيض *Candida albicans* حساسية تجاه التوبراميسين Tobramycin والبيبميديك Pipemidic إذ بلغت أقطار هالة التثبيط 10 و 9 مم على التوالي.

الاستنتاجات:

1- المذيبات القطبية كالماء والإتانول أفضل لاستخلاص المركبات الفينولية مقارنة بالمذيبات غير القطبية مثل الكلوروفورم وهذا السبب إما أن يعود إلى أن المذيبات القطبية كالماء والإتانول أفضل المذيبات لاستخراج الفينول مقارنة مع المذيبات الغير قطبية مثل الكلورفورم ، حيث أن طبيعة المذيب المستخدم في الاستخلاص تعتبر مهمة لتعزيز ذوبانية المركبات ويعتمد اختيار المذيب على معرفة الخصائص الكيميائية التي تشكل أساس التفاعلات بين المذيب و المركبات.

2- تفوق المستخلصات المائية والكلوروفورمية على الفيتامين C بالقدرة على كبح الجذور الحرة.

3- للزيت العطري في نبات الفاغر المسكي تأثير تثبيطي في نمو الجراثيم المعزولة من اللحوم الحمراء حيث بدت حساسية الكلبسيلة عالية لزيت الفاغر مقارنة بالسلالات الجرثومية الأخرى كالزائفة الزنجارية والعنقوديات الذهبية، حيث بلغ قطر هالة التثبيط 20 مم، كما بلغ قطر هالة التثبيط 14 مم عند كل من الزائفة الزنجارية والمبيضات البيض، كما أبدت السالمونيلة والشيغلة والإشريكية القولونية مقاومة لزيت الفاغر المسكي بتركيزي % (1 – 0.5)..

التوصيات والمقترحات Recommendations and Suggestions

1- إيجاد طرائق حفظ جديدة بعيدة عن طرائق الحفظ المعتمدة بالمواد الصنعية والتوجه إلى كل ما هو طبيعي ومتجدد وصحي.

2- إجراء دراسات فيما يتعلق بفصل وتنقية وتشخيص المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية ومحاولة تطبيقها على الأغذية وفق الشروط القياسية.

3- استعمال الإضافات الغذائية الطبيعية التي تعد مواد مضادة للجراثيم بدون حدوث ضرر صحي على المستهلك وتوسيع دائرة استعمالها فيما يتعلق بالجوانب الغذائية والصحية.

المراجع References

1. Akkol, E.K.; Yalçin, F.N.; Kaya, D.; Çali¸s, I.; Yesilada, E.; Ersöz, T. (2008). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive actions of some *lamium* species. J. Ethnopharmacol., 118, 166–172.
2. AlHafez, M., Kheder, F., and AlJoubbeh, M., (2014). Polyphenols, flavonoids and (-) epigallocatechin gallate in tea leaves and in their infusions under various conditions, Nutrition and Food Science, 44, 5: 455-463.
3. Ali Nizam A., Hussain M. (2016). Prevalence, Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*, CNS and determination of MRSA, MRCNS strains in clinical samples. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol.38, No.1, 167-180.
4. Alipieva, K.; Evstatieva, L.; Handjieva, N.; Popov, S. (2003). Comparative analysis of the composition of flower volatiles from Lamium L. Species and Lamiastrum galeobdolon heist. Ex fabr. Z. Nat. C, 58, 779–782.
5. AL-Sulami, A. A., AL-Rubiay, K. K., and Affat, A. M., (2001). An inhibitor of Staphylococcus aureus exfoliative Toxin. Eastern Mediterranean Health-dournal, 7:35-36.
6. Amaral , J . A ., Ekins , A ., Richards , S . R. and Knowles , R. (1998) . Effect of selected monoterpenes on methane oxidation denterfication and aerobic metabolism by bacteria pure culture, Applied . Environ. Microbial . 64:520-525
7. Anandi M., Juan C. (2009). Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54:130-133.

8. Andriopoulo,s V., Gkioni, M. D., Koutra, E.,Mastropetros, S.G., Lamari, F.N., Hatziantoniou, S., 14 Kornaros, M.. (2022). Total phenolic content, biomass composition, and antioxidant activity of select 15 marine microalgal species with potential as aquaculture feed . *Antioxidants* , 11 (1320 ,) 1 – 21 . doi: 16 10.3390/ANTIOX11071320
9. Astani A., Reichling J., Schnitzler P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.
10. Azaat , A., Babojian ,G. and , Issa, N. (2022). Phytochemical Screening, Antioxidant and Anticancer 28 Activities of *Euphorbia hyssopifolia*L. against MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line .*Journal of the* 29 *Turkish chemical society. Section A: Chemistry* , 9 (1 :) 295 - 310 . DOI : 30 https://doi.org/10.18596/jotcsa.1021449.
11. Bendiksby, M.; Brysting, A.K.; Thorbek, L.; Gussarova, G.; Ryding, O .(2011). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus Lamium L. (lamiaceae): Disentangling origins of presumed allotetraploids. Taxon, 60, 986–1000.
12. Bialonska D., Ramnani P., Kasimsetty S., Muntha K., Gibson G., Ferreira D. (2010). The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. Int. J. Food Microbiol. 140:175-182.
13. Brenes A., Roura E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. Anim. Feed Sci. Technol. 158, 1-1410.1016/j.anifeedsci.2010.03.007.
14. Bubueanu, C., Gheorghe, C., Pirvu, L. U. C. I. A., Bubueanu, G. E. O. R. G. E. (2013). Antioxidant activity of butanolic extracts of Romanian native species–*Lamium album* and *Lamium purpureum*. Romanian Biotechnological Letters, 18(6), 8855-8862.
15. Cari Larico, H. L., & Diaz Quispe, E. R. (2017). Microbiota de la cavidad bucal y unidad dental en atenciones a 3824 metros sobre el nivel del mar, desarrollado en el policlinico de la policia y la Universidad Andina "Néstor Cáceres Velásquez"-Juliaca 2015.
16. Czerwińska M.E., Swierczewska A., Wozniak M., Kiss A.K., (2017). Bioassay-guided iisolation of iridoids and phenylpropanoids from aerial parts of *Lamium album* and their anti-inflammatory activity in human neutrophils. Planta Med. 83:1011–1019.

17. Doughari J. H., Pukuma M., D. N. (2007). Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. African Journal Biotechnology. 6(19): 2212-2215.
18. EL-Sayed, Z. I., (2008). Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oil of *Lamium maculatum L*. Grown in egypt. *database [Wiley (Wiley Int. USA)]*, *15*(22), 23.
19. Flamini, G.; Cioni, P.L.; Morelli, I. (2005). Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four lamium species from italy: L. purpureum, L. hybridum, L. bifidum and L. amplexicaule. Food Chem. 91, 63–68.
20. Fung, D. W. C., J. Edwards, And B. A. Crozier-Dodson., (2008). At-Line Methods For Controlling Spoilage, P. 289–318. In F. Toldra` (Ed.), Meat Biotechnology.Springer, New York, NY.
21. Garrity G. M.; Brenner D.; Krieg N., Staley J. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, USA, 2nd Ed., Vol. 2, P. 1-1135.
22. George D. R., Smith T., Shiel R., Sparagano O., Guy J. (2009). Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. Vet. Parasitol. 161, 276-282.
23. Ghoneim, M.; Musa, A.; El-Hela, A.; Elokely, K. (2018).Evaluation and understanding the molecular basis of the antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of secondary metabolites isolated from *Lamium amplexicaule*. Pharmacogn. Mag., 14, 3–7.
24. Gislene G. F., Nascimento J., Freitas P., Giuliana L., (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, Braz. J. Microbiol. vol.31(4). ISSN 1517-8382On-line version ISSN 1678-4405.
25. Harley, J. P., (2005). Laboratory exercises in microbiology, 6th ed. McGraw Hill, New York, NY.
26. Hussain M., Ali Nizam A., Abou-Isba S., Abou-Younes A., Khaddour W. (2018). A Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Lyophilized Crude Extracts of Bacillus subtilis against Clinical and Food-Borne Pathogens, International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences (IRJPMS), Volume 1, Issue 3, pp. 15-21, 2018.

27. Ibrahim H. M., Abou-arab A., Abu Salam F. (2010). Addition of some natural plant extracts and their effects on lamb patties quality. J. Food Technol., 8, 134-142.
28. Kelmanson J., Jager A., Standen J. (2000). Zulu medicinal plants with antibacterial activity. J. Ethnopharmacol., 69:241-246.
29. Köse, Y. B., İşcan, G., Demirci, B., Başer, K. H. C., Çelik, S., (2007). Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*. Fitoterapia, 78(3), 253-254.
30. Layqa M., Ali Nizam A., Alqadi I. (2015). Antibacterial Activity of White and Blue Wild Myrtle Parts Extracts Against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Egypt. J. Microbiol. 50, 17-29.
31. Martinez-Tome M., Jimenez A., Ruggieri S., Frega N., Strabbioli R., Murcia M. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. J. Food Prot., 64,1412-1419.
32. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control 18, 414–420.
33. Pirbalouti A. G., Jahanbazi P., Enteshari S., Malekpoor F., Hamedi B. (2010). Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. Arch. Biol. Sci. Belgrade. 62(3): 633-642.
34. Ripoll G., Joy M., Muñoz F. (2011). Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. Meat Sci., 87, 88-93.
35. Saha, M. R., Hasan, S. M. R., Akter, R., Hossain, M. M., Alam, M. S., Alam, M. A., Mazumder, M. E. H., (2008). In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of mimusops elengi linn. Bangl. J. Vet. Med. 6(2): 197–202.
36. Salehi, B., Armstrong, L., Rescigno, A., Yeskaliyeva, B., Seitimova, G., Beyatli, A., and Lucarini, M., (2019). *Lamium* Plants—A Comprehensive Review on Health Benefits and Biological Activities. Molecules, 24(10), 1913.
37. Sapkota R., Dasgupta R., Rawat D. (2012). Antibacterial effects of plants extracts on human microbial pathogens and microbial limit tests. Int. J. Res Pharm. & Chem., 2(4): 926-936.

38. Savchenko T, Blackford M, Sarker S D, Dinan L. (2001).Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: Identification and distribution within plants. Biochem Syst Ecol. 29:891–900.
39. Shaghaghi, M., Manzoori, J., and Jouyban, A., (2008). Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, Food chemistry, 108 (2): 695-701.
40. Silva F., Ferreira S., Duarte A., Mendonça D., Domingues F. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against Candida species and potential synergism with amphotericin B. Phytomedicine 19, 42-47.
41. Singleton, L., Orthofer, R., and Lamuela-Ravents, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, Methods in enzymology, 299: 152-178.
42. Sørensen, J.M., Katsiotis, S.Th. (2000). Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from Cretan *Vitex agnus castus* fruits. Planta Med. 66: 245-250.
43. Tajkarimi M. M., Ibrahim S., Cliver D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21, 1199-1218.
44. Tiemersma E.W., Bronzwaers S., Lyytikäinen O., Degener J., Schrijnemakers P., Bruinsma N., Monen J., Witte W., Grundman H. (2004). European antimicrobial resistance surveillance system participants: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe. Emerg. Infect. Dis. 10:1627–1634.
45. Trefan L., Bürger L., Bloom-Hansen J., Rooke J., Salmi B., Larzul C., Terlouw C., Doeschl W. (2011). Meta-analysis of the effects of dietary vitamin E supplementation on α-tocopherol concentration and lipid oxidation in pork. Meat Sci., 87, 305-314.
46. Ulubelen, A., Topcu, G., Eri, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., Bozok-Johansson, C. (1994). Terpenoids from *Salvia* sclarea. Phytochemistry, 36(4), 971-974.
47. Vaithiyanathan S., Naveena B., Muthukumar M., Girish P., Kondaiah N. (2011). Effect of dipping in pomegranate (*Punica granatum*) fruit

juice phenolic solution on the shelf life of chicken meat under refrigerated storage (4 °C). Meat Sci., 88, 409-414.

48. Yamamura A., Murai A., Takamatsu H., Watabe K. (2000). Antimicrobial effect of chemical preservatives on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Health Sci. 46: 204-208.
49. Yang, D., Michel, L., Chaumont, J. P., Millet-Clerc, J. (2000). Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. Mycopathologia, *148*(2), 79-82.
50. Yogesh K., Ali J. (2014). Antioxidant potential of thuja (*Thuja occidentalis*) cones and peach (*Prunus persia*) seeds in raw chicken ground meat during refrigerated (4±1°C) storage. J Food Sci. Technol., 51, 1547-1553.
51. Yordanova, Z.P., Zhiponova, M.K., Iakimova, E.T., Dimitrova, M.A., Kapchina-Toteva, V.M., (2014) .Revealing the reviving secret of the white dead nettle (*Lamium album* L.). Phytochem. Rev. 13, 375–389.
52. Zheng W., Wang S. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem., 49, 5165-5170.
53. Zink D. L. (1997). The impact of consumer demands and trends on food processing. Emerging Infect. Dis. 3, 467-469.