جامعة الزاوية
كليـــــة العلـــوم
قسم علم الأحياء ـ شعبة علم النبات

دراسة التأثير المضاد للبكتيريا لمستخلص أوراق المورينجا (أوليفيرا) على بعض الأنواع البكتيرية

The Study of Antibacterial Effect of *Moringa oleifera* Leaves Extract on Some Bacteria Species

إعداد الطالبة :

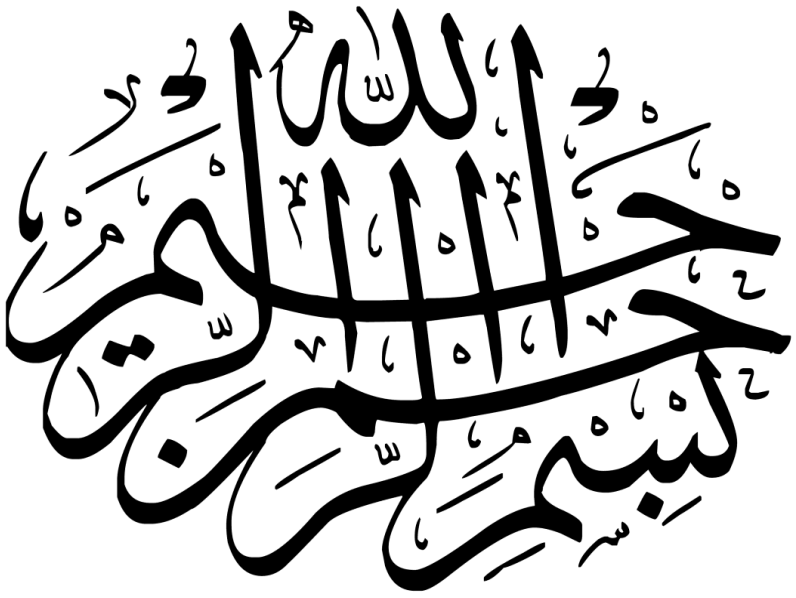
كريمـة علـــي محمـــد سلمـــان

إشراف :

أ.د. الأخضر محمد المحمودي أستاذ

د. أحـــلام راشـــد الفيتـوري أستاذ مشارك

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات الإجازة العالية (الماجستير) في علوم الأحياء بتاريخ 1446/01/05 هـ – الموافق 2024/07/11م



﴿وقل اعملوا فسيرى الله عملكم ورسوله والمؤمنون﴾

صدق الله العظيم

(**التوبة** :105)

الإهداء

أهدى عملي هذا:

إلى سيد ومعلم البشرية (محمد صلى الله عليه وسلم) .

إلى من ربتني وأنارت دربي ، وأعانتني بالدعوات ،أمدها الله بالصحة والعافية (أمي الحبيبة) .

إلى من أحمل اسمه بكل افتخار ، حفظه الله وأطال في عمره بصحة وعافية (أبي الغالي) .

إلى من وهبني الله نعمة وجوده في الحياة ، وكان عوناً لي في مسيرة بحثي راجية من الله أن يبارك فيه ويحفظه بعينه التي لا تنام (زوجي طه عبد المولى) .

إلى فلذة كبدي (عمر، عبد الرحمن، نوفل، ربى، رفا) أقدم لهم حبي وشكري ممزوجا بالاعتذار لانشغالي عنهم طيلة فترة إعداد هذه الرسالة .

إلى اللواتي شاركنني لحظات الضحك والبكاء (أخواتي) .

إلى من شاركوني هذا الدرب، وسعدوا بنجاحي (صديقاتي) .

إلى كل من أحببتهم وأحبوني ولم تسعفني الذاكرة لذكرهم .

الشكر والتقدير

قال الله تعالى (وَمَن يَشْكُرْ فَإِنَّمَا يَشْكُرُ لِنَفْسِهِ) سورة لقمان ، من الآية 12

ليس بعد تمام العمل من شيء أجمل من الحمد، فالحمد والشكر لربي سألته أن يجود علي بخير علم ينفعنا في الدارين، وأن يرزقنا الإخلاص في القول والعمل.

قال رسول الله صلى الله عليه وسلم (من لا يشكر الناس لا يشكر الله عز وجل).

إقراراً مني بالفضل واعترافاً بالجميل، أتوجه بجزيل الشكر والامتنان إلى : أستاذي الفاضل الدكتور " الأخضر المحمودي " أولاً من أجل قبوله تولي مهمة الإدارة العلمية لهذه الرسالة، وثانياً لأخلاقه العالية، وعلمه الغزير، وسعة صدره ، فضلاً عن التوجيهات السديدة والجهد والمتابعة في إخراج هذا العمل بهذه الصورة.

وكذلك نشكر الدكتورة " أحلام راشد " كمشرف ثانٍ ، فجزاها الله عنا خير الجزاء.

نتقدم بفائق التقدير والاحترام إلى رئيس لجنة المناقشة وباقي أعضاء اللجنة على قبولهم المشاركة في إثراء هذا البحث بالتوجيه القيم والنصائح التي من شأنها تحسين عملي هذا ،وإخراجه في أفضل شكل ممكن.

ثم إنه لا يسعني إلا أن أقر بالمعروف لكل من ساعدني في إتمام العمل التطبيقي " المركز الليبي للبحوث الطبية "ونخص الدكتور صلاح بحرون ، والدكتورة أمينة بشينة كذلك كل من قدموا لي جهوداً ومساعدات برحابة صدر داخل المركز راجين من الله أن يمن عليهم دوام الصحة والعافية .

كذلك الشكر كل الشكر إلى من أنار فكري ،وكان لي الدليل في بداية دربي، والمثل الأعلى والسند في تكملة مشواري " زوجي "

وفي الآخر نرجو من الله أن يجعل عملي هذا نفعاً يستفيد منه جميع الطلبة المقبلين على التخرج .

المستخلص

من مبدأ هذه الدراسة البحث عن بدائل للمضادات الحيوية التي واجهت ولا زالت مشكلة مقاومة العوامل الميكروبية التي صممت للقضاء عليها، هدفت هذه الدراسة لاختبار مدى تأثير مستخلصات أوراق المورينجا أوليفيرا *Moringa oleifera lam* على عدد من السلالات البكتيرية الموجبة لصبغة جرام(*Staphylococcus*) والسالبة لصبغة جرام (*Klebsiella, Escherichia coli, Pseudomonas*) ،التي أظهرت مقاومة متعددة (Multible resistance) عند اختبار حساسيتها لعدد من المضادات الحيوية شائعة الاستخدام .

تم استخلاص المركبات الفعالة من المسحوق المجفف لأوراق المورينجا ،باستخدام مذيبات مختلفة (الإيثانول، الميثانول، إيثيل أسيتات والماء) ، حيث يبين الكشف المبدئي للمستخلصات احتواءها على المركبات الفعالة الأساسية (الفينولات، الفلافونيدات، التانينات والقلويدات مع احتمالية وجود مركبات أخرى)، كما تبين من خلال نتائج استخدام تقنية شرائح الكرماتوجراف (TLC).

لتقدير التأثير المضاد للمستخلص الميثانولي بتركيز 100 ملجرام/ مل على سلالات الأنواع المختلفة، باستخدام طريقة الانتشار في الحفر Agar diffusion method، أظهرت النتائج أن للمستخلص تأثيراً مضاداً ملحوظاً ضد جميع السلالات بمتوسط أقطار تثبيط تراوحت مابين (20.5±1.87مم – 24.67±3.14مم) ولكن بتأثير أقل من تأثير المضادات الحيوية الفعالة، حيث سجلت متوسطات أقطار تثبيط تراوحت مابين (21.42±0.90 – 38.33±3.14مم) ،التأثير الأعلى للمستخلص كان ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام.

لتقييم كفاءة تأثير المستخلص الخام من خلال مقارنة تأثيره بتأثير مضاد حيوي ذي فعالية ومؤثر ضد كل نوع بكتيري كشاهد موجب قياسي، بينت النتائج أن نسب التأثيرالمضاد للمستخلص بلغت 64.4%، 66.51%، 68.18%، 93.74% ضد سلالات بكتيريا ، *E.coli spp, Pseudomonas spp, Klebsiella spp ,Staph.aureus*على التوالي مقارنة بنسبة تأثير المضادات الحيوية الفعالة المستخدمة ضد كل نوع بكتيري (Ampicillin (AM10), Ciprofloxacin (CIP5), Gentamicin (GN10 و(Kanamycin (K30 على التوالي.

بينت نتائج الدراسة فعالية مميزة في قدرة المستخلص في إعاقة النمو والقضاء التام على السلالات البكتيرية المختلفة لتحقيق أقل تركيز مثبط (MIC) وأقل تركيز قاتل (MBC) 12.5ملجرام /مل و25ملجرام /مل ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام وتراوح التركيز مابين MIC =25-50ملجرام/مل وMBC=50-100ملجرام/مل بالنسبة للبكتيريا السالبة .

دمج المستخلص الخام مع المضادات الحيوية فاقدة الفعالية Ampicillin AM10 ضد السلالة البكتيرية2 *Staph.aureus* وTE10 Tetracycline ضد السلالة البكتيرية 2 *Klebsilla spp* أظهر حدوث تحفيز في تأثير المضادين بنسبة بلغت حوالي 48%، دلالة على حدوث نشاط تشاركي (Synergistic activity) بين المستخلص والمضاد.

من خلال النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة يمكن الإستنتاج بأن لمستخلص أوراق المورينجا تأثيراً مضاداً فعالاً ضد البكتيريا ،وهناك إمكانية لاستخدامه مستقبلاً كدواء بديل أو داعم مع المضاد الحيوي الموصوف لعلاج العديد من الأمراض البكتيرية.

الكلمات الدالة: النشاط المضاد للبكتيريا، مستخلص أوراق المورينجا أوليفيرا.

Abstract

From the principle of this pure study of alternatives to antibiotics that had been facing the problem of resistance from bacterial agents which they were designed to destroy.

Therefore, this study was conducted to investigate the extent of *Moringa oleifera lam* leaves extracts against a number of Gram+ve strains of *Staph.aureus a*s well as strains of Gram-ve bacteria (*E.coli, Pseudomonas spp* and *klebsilla spp).*

These strains showed multi-resistance when they were tested for their antibiotic sensitivity against some commonly used antibiotics.

Active compounds that the extracts contained obtained by dissolving dried *Moringa oleifera* leaves powder in different solvents (Ethanol, Methanol, Ethyl acetate, and Water).

Initial photoscreening revealed the presence of several essential active compounds (Alkaloids, tannins, flavonoids, and phenols)with more expected to be contained according to the observations on T.L.C plates.

Antibacterial effect of 100mg/ml methanolic extract was determined using agar diffusion method. Results showed a remarkable antibacterial effect against all bacterial strains tested with main inhibition zones between(20.5±1.87mm-24.67±0.90mm).

The effect of the extract was less than that a chieved by active antibiotics where main inhibition zones of(21.42±0.90mm-38.33±3.14mm)were recorded. The efficiency of crude extract was evaluated by comparing the effect of the extract with the effect of an active antibiotic against each bacterial species.

These antibiotics were considered as standard positive control. Results showed that the percentage of extract antibacterial effect reached 64.4%, 66.4%, 68.18% and 93.74% against *Staph.aureus, Pseudomonas spp, klebsilla spp* and *E.coli* strains respectively compared with the effect of active antibiotics (Ampicillin (AM10), Ciprofloxacin(CIP5), Gentamicin (GN10), and Kanamycin (K30) against each bacterial species strains respectively.

Results of this study revealed that the extract had distinctive effectiveness in its ability not only to inhibit the growth of bacteria but also destroying them.

This was noticed by achieving MIC. And MBC. of 12.5mg/ml and 25mg/ml against G+vt bacteria and between MIC=25-50mg/ml and MBC=50-100mg/ml againstG-ve bacteria.

The combination of extract with un effective antibiotics(Ampicillin against *Staph aureus2* strain and Tetracycline against *Klebsilla spp2)*showed a noticed enhancement in the antibacterial effect as an evidence of extract antibiotic synergistic activity effect.

From the results of this study it can be concluded that *Moringa oleifera* leaves extract had an effective antibacterial effect which make it valuble agent to be used in the future as an alternative or enhancing agent in combination with a prescriped antibiotic to treat different bacterial diseases.

Key words: Antibacterial Activity, *Moringa oleifera* Leaves Extract.

فهرس المحتويات

الآية I

الإهداء II

الشكر والتقدير III

المستخلص IV

Abstract V

فهرس الجداول VIII

فهرس الأشكال IX

فهرس الملاحق X

1- المقدمة 2

2- الدراسات السابقة 9

3- المواد وطرائق العمل 16

1.3 – المواد 17

1.1.3– المواد الكيميائية 17

2.1.3 –الأجهزة والمعدات 17

3.1.3-الأوساط الزراعية 18

4.1.3 - المضادات الحيوية 18

2.3 - طرائق العمل 19

1.2.3- جمع العينات النباتية وتهيئتها 19

2.2.3- العزلات الجرثومية 19

3.2.3- إعداد المستخلصات النباتية لأوراق المورينجا اوليفيرا 20

1.3.2.3– تحضير المستخلص الخام 20

4.2.3– الكشف المبدئي عن المركبات الفعالة في المستخلص الخام 21

5.2.3– فصل المركبات الفعالة باستخدام تقنية شرائح الكروماتوجراف 21

6.2.3- تعيين حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة الأقراص 22

7.2.3- اختبار التأثير المضاد لمستخلص أوراق المورينجا أوليفيرا ضد البكتيريا باستخدام طريقة الانتشار في الحفر 24

8.2.3- تقدير التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC لمستخلص أوراق المورينجا أوليفيرا 24
9.2.3- دراسة مدى قدرة المستخلصات النباتية على دعم المضادات الحيوية فاقدة الفعالية 25
10.2.3- التحليل الإحصائي 25
4. النتائج.....26
1.4- الكشف المبدئي عن المركبات الفعالة لمستخلصات أوراق المورينجا أوليفيرا.....27
2.4- فصل المركبات الفعالة للمستخلص الخام لأوراق المورينجا باستخدام تقنية شرائح الكروماتوجراف 27
3.4- اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة الأقراص.....29
1.3.4-اختبارتقدير حساسية سلالات بكتيريا *Pseudomonas* للمضادات الحيوية.....29
2.3.4 – اختبار تقدير حساسية سلالات بكتيريا *Klebsiella* للمضادات الحيوية 29
3.3.4 – اختبار تقدير حساسية سلالات بكتيريا *Escherichia .coli* للمضادات الحيوية 30
4.3.4 – اختبار تقدير حساسية سلالات بكتيريا *Staphylococcus* للمضادات الحيوية 36
4.4- اختبار التأثير المضاد لمستخلص أوراق المورينجا أوليفيرا ضد البكتيريا.....31
1.4.4-التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Pseudomonas* 31
2.4.4- التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Klebsiella*.....*32*
3.4.4-التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Escherichia. coli* 32
4.4.4- التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Staphylococcus*.....*33*
5.4- تقدير التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC لمستخلص أوراق المورينجا أوليفيرا 34
6.4- دراسة مدى قدرة المستخلصات النباتية في دعم المضادات الحيوية فاقدة الفعالية 35
5- المناقشة 37
6- التوصيات.....44
7- المراجع 46
8- الملاحق 57

فهرس الجداول

(1) المضادات الحيوية المستخدمة 18
(2) السلالات البكتيرية السالبة لصبغة جرام 19
(3) السلالات البكتيرية الموجبة لصبغة جرام 19
(4) يبين تقدير حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بحسب أقطار مناطق التثبيط (CI.SI,2013).....23
(5) الكشف المبدئي على المركبات الفعالة لمستخلصات أوراق المورينجا.....27
(6) قيم معامل الإعاقة (RF.values) للمركبات الفعالة بمستخلصات أوراق المورينجا المعاملة بتقنية TLC بأطوار متحركة مختلفة.....28
(7) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Psedomonas* 29
(8) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Klebsiella* 30
(9) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Escherichia coli*.....30
(10) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Staphylococcus* 31
(11) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Ciprofloxacin لسلالات بكتيريا *Pseudomonas* 32
(12) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Gentamicin (GN10) لسلالات بكتيريا *Klebsiella*.....32
(13) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Kanamycin (K30) لسلالات بكتيريا *Escherichia .coli*.....33
(14) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Amoxicillin (AX30) لسلالات بكتيريا *Staphylococcus*.....33
(15) يوضح أقل تركيز مثبط (MIC) وأقل تركيز قاتل (MBC) للمستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا ضد سلالات بكتيريا *Pseudomonas, Klebsilla, Escherichia. coli, Staphylococcus*.....34

فهرس الأشكال

(1) الشكل الظاهري لأوراق المورينجا.....5
(2) الشكل الظاهري لأزهار المورينجا 6
(3) الشكل الظاهري لثمار المورينجا 6
(4) الشكل الظاهري لبذور(حبوب) المورينجا 7
(5) الشكل الظاهري لجذور المورينجا.....7
(6) جهاز المبخر الدوار Ratatory evaporator.....18
(7) فصل المركبات الفعالة باستخدام تقنية شرائح الكروماتوجراف.....22
(8) متوسطات أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد (AM10) Ampicillin والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus. 2* 35
(9) متوسطات أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد (TE10) Tetracyclin والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية2 *Klebsiella .spp*.....36

فهرس الملاحق

(10) الكشف المبدئي عن الفلافونيدات 58
(11) الكشف المبدئي عن القلويدات 58
(12) يوضح الفصل الكروماتوجرافي بواسطة كروماتوجراف الطبقة الرقيقة وعدد النقاط الممثلة للمكونات المفصولة 59
(13) يوضح المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة 60
(14) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا Pseudomonas 61
(15) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا Klebsiella 61
(16) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا Escherichia coli 62
(17) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا Staphylococcus 62
(18) تجهيز الأطباق لاختبار التأثير المضاد للبكتيريا بطريقة الانتشار في الحفر قبل وضعها في الحاضنة 63
(19) يوضح اختبار التأثير المضاد لمستخلصات أوراق المورينجا ضد البكتيريا 63
(20) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Ciprofloxacin لسلالات بكتيريا Pseudomonas 64
(21) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Gentamicin(CN10) لسلالات بكتيريا Klebsiella 65
(22) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Kanamycin K30 لسلالات بكتيريا Escherichia .coli 66
(23) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Amoxicillin AX30 لسلالات بكتيريا Staphylococcus 67
(24) أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد Tetracyclin (TE10)والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية2 Klebsiella spp 68
(25) أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد Ampicillin (AM10) والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية Staphylococcus aureus.2 68

الفصل الأول

1- المقدمـــة

Introduction

قال الله تعالى في كتابه الكريم ﴿ **وَفِي الْأَرْضِ قِطَعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِنْ أَعْنَابٍ وَزَرْعٍ وَنَخِيلٍ صِنْوَانٍ وَغَيْرِ صِنْوَانٍ تسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفَضِّلُ بَعْضَهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأُكلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ**﴾ الرعد 4 .

جعل الله عز وجل النبات غذاء لا يستغنى عنه في الحياة، فقد أوجد الله منه الداء والدواء، وتاريخ التداوي بالأعشاب قديم جدا ، يرجع إلى العصور الأولى من التاريخ ، حيث اعتمد عليه الأقدمون اعتماداً كلياً وخاصة في علاج الكثير من الأمراض بواسطة تناول الأعشاب البرية والنباتات الطبية والعطرية التي تعرف بالأدوية الشعبية، وتعد النباتات الطبية مصدرا أساسيا لصحة الإنسان ، ولا تزال العديد من الثقافات التقليدية تثمن بالوصفات الطبية النباتية وأهميتها الوقائية والعلاجية ومنافعها الأخرى، تعد العقاقير المضادة للأحياء المجهرية من أهم اكتشافات الباحثين خلال القرن العشرين، إذ إنها قللت من نسب أو معدل الوفيات بدرجة كبيرة، كما أنها ساهمت في معالجة الكثير من المشاكل الصحية الناتجة عن نشاط الأحياء المجهرية الممرضة، إلا إنه في أواخر القرن، أثبتت الدراسات أن الجراثيم بإمكانها أن تكتسب المقاومة لمثل هذه العقاقير أو المكونات الفعالة النشطة بها بعد عدة أجيال (Uwaezuoke and Aririatu,2004)، إن ظهور وانتشار مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic Resistance بين أنواع سلالات البكتيريا الموجبة والسالبة الجرام، دفع الباحثين بمجال العلاج إلى اكتشاف بدائل علاجية للمضادات الحيوية، ومن هذه البدائل النباتات الطبية وماتحتويه من مكونات فعالة مضادة للجراثيم مثل الفينولات Phenols ،وأشباه القلويدات Alkaloids والزيوت الأساسية Essential oils والراتنجات Resins وغيرها من المواد الطبيعية التي أكدت تأثيراتها التثبيطية في علاج الأمراض الجرثومية (Essawi and Srour, 2000)، لذلك تم إخضاع حوالي 20% من النباتات الموجودة في العالم لاختبارات بيولوجية ودوائية، ويتم في البلدان المتقدمة الحصول على عدد كبير من المضادات الحيوية الجديدة التي يتم إدخالها للسوق من الموارد الطبيعية أو شبه الاصطناعية حيث أفادت منظمة الصحة العالمية بأن قرابة 80% من سكان العالم خاصة في البلدان المتقدمة يعتمدون على الأدوية المشتقة من النباتات؛ من أجل الرعاية الصحية (Gurip and Fakim, 2006)، أشار الكثير من الباحثين إلى أن استخدام المستخلصات النباتية كان لأسباب عديدة ،منها وفرتها ،وسهولة الحصول عليها، وقلة كلفتها ، والأهم من هذا كله أنها أكثر أمانا لقلة تأثيراتها الجانبية (الجنابي وكمال، 2014).

أجريت العديد من الدراسات على أنواع مختلفة من النباتات التي أثبتت فعاليتها ضد نمو ونشاط العديد من البكتيريا مثل نبات الزنجبيل، الجوافة، الليمون، الريحان، القراض والمورينجا أوليفيرا، وغيرها، نظرا لكثرة إستخدام النباتات وقلة تكلفتها ،وماتتميز به من صفات طبية ذات استخدام واسع، لذلك تم اختيار نبات المورينجا أوليفيرا لاختبار مدى تأثير مستخلصاته على بعض الأنواع البكتيرية .

لقد لجأ العلماء في الآونة الأخيرة إلى إجراء أبحاث على النباتات، للحصول على علاجات طبيعية لتقوية المناعة والتقليل من الأخطار الناجمة عن الإفراط في استخدام المضادات الحيوية ومايترتب عنها من زيادة مقاومة الميكروبات لهذه المضادات المستخدمة بصورة مستمرة (Karaman *et. al.*, 2003)

نظرا لارتفاع عدد الوفيات في المدن النامية نتيجة الالتهابات التي تسببها أنواع من البكتيريا بحث العلماء لبديل منخفض التكلفة بديل عن المضادات الحيوية المنتجة صناعيا بسبب ارتفاع أسعارها، والعمل في مشروع العلاج بالنباتات الطبية لاحتوائها على مركبات مضادة للأحياء المجهرية، وبذلك يمكن استخدامها في علاج الأمراض المعدية التي تسببها البكتيريا مثل *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* والتي تنتشر في نطاق واسع في الطبيعة مما تسبب الوفيات وأمراض خطيرة بين السكان (Dubey and Maheshwari, 2002).

يعد نبات المورينجا *Moringa oleifera* أحد النباتات الطبية المتواجدة في الوطن العربي، ورغم أنه من الأنواع الأصلية لشمال شرق الهند لكنه مزروع اليوم في جميع المناطق الإستوائية من العالم وفي أوائل القرن العشرين أصبحت تزرع في أفريقيا من خلال التجارة والتبادل التجاري بين الدول، وفي هذه البلدان يتم استخدامه كنبات طبي وأيضا كطعام (Theophile, 2014)، وتعتبر المورينجا أوليفيرا من الأشجار المعمرة تمتاز بخصائصها الطبية والغذائية، تتبع عائلة Moringaceae واسمها العلمي *Moringa oleifera* تسمى شجرة البان (الأمين، 2012)، شجرة الفجل أو الطبل (Shih *et al.*, 2011) كما يشار اليها بشجرة الحياة أو (الشجرة المعجزة) وذلك لأهميتها وتعدد استخداماتها، وهي تعتبر واحدة من أكثر الأشجار المفيدة في العالم، ويمكن استخدام كل جزء تقريبا في الغذاء أو التطبيقات المفيدة الأخرى .(Quattrocchi and Umberto, 2000) ولأوراق المورينجا قيمة غذائية بالغة الأهمية للإنسان في جميع الأعمار، بالنسبة للأطفال الذين تتراوح أعمارهم من 1 – 3 سنوات فإن استهلاك 100 جم من الأوراق الطازجة يوفر مايقارب 50% من الاحتياجات اليومية للكالسيوم والحديد والبروتينات، كما ينصح باستخدام مسحوق الأوراق للنساء الحوامل والمرضعات والأطفال فوق 6 أشهر، والأشخاص المسنين والمصابين بفيروس نقص

المناعة فالأوراق تحسن من إنتاج الخلايا، لذلك يوصي بمسحوق المورينجا في الصيدليات (Atakpama *et al*., 2014) وكذلك لأوراق المورينجا العديد من الأنشطة البيولوجية : مضادة لتصلب الشرايين، مضادة للأكسدة، منع الاضطرابات القلبية ومضادة للتخثر (Chumark *et al*., 2008. Iqbal and Bhanger, 2006)

مستخلص نبات المورينجا يعالج أمراض القلب والأوعية الدموية وخافض لضغط الدم، مضاد لمرض السكر، مسكن وخافض للحرارة، مضاد للسرطان، مضاد للأكسدة، مكافح للميكروبات ومضاد للالتهابات، وتستخدم أوراق المورينجا كمكملات غذائية صحية للحد من سوء التغذية (جابو وذكار، 2017)، وتظهر المورينجا نشاطا مضادا للأكسدة في المختبر وفي الجسم الحي نظرا لوفرة الأحماض الفينولية والفلافونيدات فيها (Vongsak *et al* ., 2013)، وكذلك تحتوي أوراق المورينجا على القلويدات والتانينات والصابونيات (Oladeji *et al*., 2017) وعلى الببتيدات التي تعمل مباشرة على تثبيط نمو الكائنات الحية المجهرية عن طريق منع تكوين غشاء للخلية أو عن طريق بناء إنزيمات محللة (Bukar and Oyeyi, 2010).

الوصف المورفولوجي لنبات المورينجا أوليفيرا :

المورينجا شجرة معمرة سريعة النمو، يمكن أن تصل طولها من 7-12 متر (Foidl *et al*., 2001) لديها:

الجذع : مستقيم بشكل عام، لكنه في بعض الأحيان يكون مختلف جدا، يصل ارتفاعه إلى 1.5-2 متر قبل أن يتفرع (Besse, 1996) .

الفروع : تنمو الفروع بشكل غير منتظم وتتشكل كالمظلة (Foidl *et al*., 2001).

الأوراق : يبلغ طولها من 20-70 سم، تكون مغطاة بالرمادي في الأسفل، ولها سويقات طويلة من 8-10 أزواج من الريشات تتكون كل منها من زوجين من الريشات المتقابلة، بالإضافة إلى واحدة في القمة تكون بيضاوية الشكل (Morton, 1991)

شكل (1) يوضح الشكل الظاهري لأوراق المورينجا

حمادي وخراز، (2020)

الأزهار : بعد 8-12 شهر تبدأ الشجرة بالإزهار باستمرار على طول السنة، وتكون بيضاء مصفر ة اللون مع وجود نقاط صفراء في القاعدة (Price, 1985) .

شكل (2) يوضح الشكل الظاهري لأزهار المورينجا

حمادي وخراز، (2020)

الثمار : عبارة عن كبسولات ثلاثية الفصوص وغالبا ما يشار إليها باسم القرون، تحتوي كل ثمرة على حوالي 26 بذرة خلال مراحل نموها، يحدث إنتاج الثمار بشكل رئيسي في مارس وأبريل (Roloff *et al.*, 2009)

شكل (3) يوضح الشكل الظاهري لثمار المورينجا

حمادي وخراز، (2020)

البذور(الحبوب) : الحبوب الجافة الناضجة بالكامل مستديرة أو مثلثة الشكل، والنواة محاطة بقشرة خشبية فاتحة مع ثلاث أجنحة (Vlahov *et al.*, 2002 . Abdulkarim *et al.*, 2005)

شكل (4) يوضح الشكل الظاهري لبذور(حبوب) المورينجا

حمادي وخراز، (2020)

الجذور : عبارة عن درنات مع قطع جانبية متفرقة، تمتلك رائحة حارة مميزة، الأشجار المزروعة بواسطة البذور تكون جذر عميق وقوي (Parrotta, 2009)

شكل (5) يوضح الشكل الظاهري لجذور المورينجا

حمادي وخراز، (2020)

التصنيف العلمي لشجرة المورينجا أوليفيرا :

المملكة : النباتية Plantae

تحت المملكة : النباتات الوعائية Tracheobionta

تحت الشعبة : النباتات المزهرة Magnaliphyta

القسم : ثنائيات الفلقة Eudicots

تحت القسم : وردانيات Roside

الرتبة : الكرنبيات Brassicales

العائلة : مورينجية Moringaceae

الجنس : المورينجا Moringa

النوع : مورينجا أوليفيرا لام *Moringa oleifera Lam* **(Oslon MF, 1999)**

الفصل الثاني

الدراسات السابقة

2- الدراسات السابقة

Literature review

تحتوي النباتات الطبية على العديد من المواد الفعالة ذات الأثر النافع، والتي تلعب دورا هاما في زيادة فاعلية هذه النباتات والتي يمكن استخدامها في صورة مستخلصات مائية، ودراسة أهميتها ومدى فاعليتها لمكافحة العديد من الأمراض البكتيرية المعدية والتي تسبب أضرار عديدة (فلاتة، 2013)، وتناولت الكثير من الدراسات تأثير المستخلصات النباتية على الأحياء المجهرية وبالتالي امكانية استخدامه في علاج بعض الأمراض الناتجة عن الإصابة الميكروبية (Cowan, 1999)، وفي الآونة الأخيرة أجريت العديد من الدراسات حول تأثير مستخلصات النباتات على الممرضات المختلفة من البكتيريا والفطريات ودور هذه المستخلصات في معالجة الأمراض والإصابات المتسببة عن هذه الممرضات، وكذلك دراسة فعالية بعض من هذه المستخلصات النباتية ضد مسببات الممرضات بما فيها الجراثيم (رمضان، 2015)، ومن احد الدراسات التي أجريت للمستخلصات المائية لأوراق وبذور نبات المورينجا أوليفيرا أظهرت أن لها قدرة عالية على إزالة العكارة، والمواد العالقة ومعظم الطحالب والبكتيريا الموجودة بالمياه (الأمين، 2012)، حيث أظهرت التقارير المختلفة أن أوراق المورينجا تعتبر مخزن للمغذيات، وغنية بالفيتامينات مثل بيتا كاروتين من فيتامين ب، فيتامين أ كحمض الفوليك، فيتامين د وفيتامين ج (Mbikay, 2012)

توصل Abalaka *et al.*, (2012) إن المستخلص المائي لأوراق المورينجا أوليفيرا كان له فاعلية مضادة لبكتيريا *E.coli* وذلك لاحتوائه على نواتج الأيض الثانوي (القلويدات، الفلافونويدات، الصابونينات والتانينات) .

استنادا إلى التحليل الكيميائي النباتي الذي قام به Gupta *et al.*, (2018) إن الفينولات والقلويدات أكثر وفرة في الأوراق منها في البذور، في حين إن الفلافونويدات والصابونينات أكثر وفرة في البذور، وتوصل (Mayakrishnan *et al.*, 2018) إن كمية الفينولات في المستخلص الميثانولي لأوراق نبات المورينجا أكبر كمية وتليها الأزهار ثم الجذور وأقل كمية كانت في البذور، حيث إن الفينولات والفلافونويدات من المركبات الرئيسية الموجودة طبيعيا في النباتات الطبية التي تلعب دورا مهما في العلاج ومنع الأضرار التأكسدية التي تسببها الجذور الحرة. (Abdulaziz *et al.*, 2015)

أجرى كل من الدوغجي وأخرون، (2015) في دراسة الفاعلية التثبيطية لمستخلصات المورينجا أوليفيرا ووجدو أن للمستخلص الإيثانولي لأوراق وأزهار وبذور المورينجا فاعلية مضادة ضد بكتيريا *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*.

وجد Idris and Abubakar, (2016) في دراستهما لتقييم الفوائد الصحية لأوراق المورينجا أوليفيرا النامية في النيجر، حيث اعتمد المستخلص الميثانولي والمائي بتركيزين مختلفين (1:1 و1:2) لتحديد المحتوى الكيميائي للأوراق ونشاطه المضاد للبكتيريا، لنوعين من البكتيريا، *E. coli* ، *S. aureus* حيث أظهر المحتوى الكيميائي للأوراق وجود القلويدات، الفلافونويدات، الفينولات والتانينات في كلا المستخلصين، كما أظهر نشاطاً ملوحوظاً ضد البكتيريا المختارة بمتوسط قطر تثبيط قدر ب 12مم للمستخلص الميثانولي و10 مم للمستخلص المائي، وأن التركيز التثبيطي للحد الأدنى والقاتل لهذين المستخلصين المائي والميثانولي لنفس السلالتين البكتيريتين، في المستخلص المائي كان 1:16، 1:4 والمستخلص الميثانولي 8:1 و1:4 على نفس البكتيريا على التوالي، والحد القاتل للمستخلص الميثانولي هو 1:8 و1:8 على التوالي، وللمستخلص المائي هو 1:16 ل *E.coli*، ولايوجد تأثير ل*S.aureus*.

توصل Smith, (2016) في دراسته لمنع المخاض المبكر والاضطرابات الأخرى الناجمة عن العدوى المسببة لذلك امكانية إستخدام المستخلص الإيثانولي لأوراق المورينجا كعامل طبيعي مضاد للجراثيم ومقارنته بالمضاد الحيوي Tetracycline وقدرت منطقة التثبيط لبكتيريا *E. coli* بواسطة المستخلص الايثانولي 18 مم مقابل 14 مم بالمضاد الحيوي أي أن المستخلص الايثانولي لأوراق المورينجا مثبط بشكل كبير أكثر من المضادات الحيوية المختارة، على الرغم من أن بعض الدراسات أظهرت أن المضادات الحيوية الموصوفة بشكل شائع منها Tetracycline وCiprofloxacin تثبط بكتيريا *E.coli* بتركيزات أقل مقارنة مع مستخلصات أوراق المورينجا (Kumar *et al*., 2012)

وكذلك أوراق المورينجا تعتبر مكمل غذائي جيد جدا للتغذية ويستخدم كمضاد حيوي حيث قام (Devendra *et al*., 2011) بإجراء استخلاص لأوراق المورينجا بالكلوروفورم وإختباره ضد مجموعة من البكتيريا باستخدام طريقة الانتشار بالقرص حيث قدرت منطقة التثبيط ب 8.08 مم ضد *E.coli*، وحوالي 9.5 مم ضد *S.aureus*، بينما كانت منطقة التثبيط ضد *St.byogenes* 7 مم، و7.3 مم ضد *Aspergillius niger* لذلك استنتج أن المستخلصات النباتية لها خصائص علاجية جيدة، وتعتبر أوراق المورينجا مصدر لمضادات البكتيريا حيث

اجريت دراسة أخرى ل (Kumar *et al*., 2012) أثبتوا فيها أنه هناك نشاط مضاد للميكروبات للمستخلصات المائي والايثانولي والميثانولي لأوراق نبات المورينجا بطريقة إنتشار القرص واختبار التركيز المثبط الأدنى، حيث أظهرت جميع المستخلصات تأثيرا كبيرا على الكائنات الحية المختبرة، أظهر مستخلص الميثانول منطقة تثبيط تقدر ب 1.15 ± 23.6 ضد *S.aureus*، والمستخلص المائي أدنى مستوى بمنطقة تثبيط تقدر 1.73±12.0 ضد *B. subtilis*، في حين أظهر المستخلص الميثانولي أعلى مستوى تثبيط بمنطقة تقدر 27.86 ضد *B. subtilis*، وتم قياس التركيز المثبط الأدنى حيث أظهر المستخلص 2.4 مغ /مل ضد *B. subtilis* و7.4 مغ/مل ضد *S.aureus*.

كما أجريت دراسة ل **(**Seleshe and Kang, 2019**)** للتحقق من الأنشطة المضادة للميكروبات لمستخلصات المورينجا لبعض الكائنات الممرضة، وتم استخدام طريقة إنتشار القرص لتقييم النشاط المضاد للبكتيريا وكذلك تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC، حيث أظهرت مستخلصات الميثانول والكلوروفورم فاعلية مثبطة واضحة ضد بكتيريا *Klebsilla pneumonia* بمنطقة تثبيط قدرت 18.25 و16.75 مم على التوالي، ومنطقة تثبيط قدرت ب 15.5 و15مم لبكتيريا *Bacillus cereus* والمثبط الأدنى للمستخلص الإيثانولي قدر 250 مع /مل ضد *B.cereus*، والمثبط الأدنى للمستخلص الميثانولي قدر ب 62 مغ /مل ضد *Streptococcus pneumonia* والمثبط الأدنى لمستخلص الكلوروفورم قدر ب 125مغ /مل ضد *E.coli, Salmonella typhimurium, S .aureus* ولم يظهر المستخلص المائي نشاط مثبط ضد هذه السلالات البكتيرية، وأثبت كل من (Bukar and Oyeyi, 2010) خلال الكشف عن النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص (الإيثانولي والكلوروفورم) لبذور وأوراق المورينجا ضد بعض الكائنات الموجودة على الأغذية . حيث أن للمستخلص الإيثانولي للأوراق نشاط واسع ضد كائنات الاختبار *E. coli, S. aureus, Ps. aeruginosa* حيث تراوحت قيم MIC (2.0 – 4.0 مغ / مل) لجميع الكائنات المختبرة، وكذلك مستخلص الكلوروفورم لبذور المورينجا فاعلية ضد *E. coli, Salmonella. typhimurium* حيث تراوحت قيم MIC بين (1.0 – 4.0 مغ / مل) ومن خلال هذه الدراسة أثبت أن مستخلصات المورينجا تستخدم كمواد معقمة عن طريق تثبيط نمو الكائنات الحية الموجودة على الأغذية، وكذلك تم اختبار مستخلصات أوراق المورينجا اوليفيرا لعلاج الأمراض المعدية ضد بكتيريا *Salmonella typhi* باستخدام طريقة الإنتشار بالقرص، حيث أظهر المستخلص الإيثانولي أعلى نشاط تثبيطي قدر ب 8 مم وذلك عند تركيز 100 مغ / مل، بينما أظهر المستخلص المائي

أقل نشاط بقطر 4 مم عند نفس التركيز، حيث كانت أنشطة هذه المستخلصات النباتية شبيهة بأنشطة المضادات الحيوية المستخدمة لعلاج حمى التيفوئيد (Doughari *et al*., 2017) .

دراسة أخرى ل (Kwami *et al*., 2020) حول دور المورينجا أوليفيرا في علاج الأمراض المرتبطة بمسببات الأمراض البكتيرية، حيث تم فحص النشاط المضاد للبكتيريا من أوراق وبذور المورينجا ضد أنواع مختارة من البكتيريا، وكان المستخلص الميثانولي للأوراق تأثير تثبيطي عالي ضد *S. aureus* بقطر تثبيطي 22 مم و*Salmonella paratyphi* بقطر تثبيطي 22 مم، وسجل المستخلص الميثانولي للبذور تأثير تثبيطي ضد *E. coli* بقطر 15 مم و *Salmonella paratyphi* بقطر 10 مم، حيث استنتج من هذه الدراسة أن المستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا أقوى من المستخلص الميثانولي للبذور في تثبيط نمو البكتيريا .

دراسة لـ (حمادي وخراز، 2020) حول الفعالية البيولوجية لنبات المورينجا النامي في منطقة وادي سوف لمستخلصات المورينجا (الأوراق، الأزهار، البذور) ضد نوعين من السلالات البكتيرية، حيث قدرت الأقطار التثبيطية ب (20 – 18 -19 مم) على التوالي ضد بكتيريا *E. coli*، بينما السلالة *S. aureus* فكانت الأقطار التثبيطية (17– 13 – 14 مم) على التوالي، واستنتج أن مستخلص الأوراق من أكثر المستخلصات فعالية ضد السلالات البكتيرية التي تم اختبارها مقارنة بالمستخلصات الاخرى، وكذلك في النيجر دراسة لتقييم الخصائص المضادة للميكروبات لمستخلصات أوراق نبات المورينجا أوليفيرا (Oluduro, 2012) ضد مسببات الأمراض المعوية مثل *E. coli, Salmonella typhimurium, S. aureus, Ps. aeruginosa* حيث أظهرت تأثير مثبط ضئيل جدا عند تركيز 30 ملغم/مل، وكانت جميع كائنات جراحة العظام المعزولة حساسة للمستخلص المائي بمنطقة تثبيط تتراوح من 12-15 ملم باستثناء *Streptococcus spp* التي لم يكن للمستخلص تأثير مثبط عليها، وتتراوح أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي بين 12-19ملم ضد هذه السلالات *Streptococcus spp, Pseudomonas fluorescens, Acinetobacter baumanil, Proteus mirabilis.*

قام Abdulkadir *et al*., (2015) بدراسة التركيبات الكيميائية والأنشطة المضادة للميكروبات لمستخلص الإيثانول لنبات المورينجا في المختبر ضد العزلات البكتيرية من *S. aureus, E. coli* شمل هذا الفحص الكيميائي النقي واختبار مضادات الميكروبات من المستخلص الإيثانولي باستخدام الإجراءات الدوائية الأساسية وقياس انتشار الاجار على مسببات الأمراض المختبرة، حيث تم اكتشاف القلويدات والفلافونيدات والصابونيات والتانينات في جميع المستخلصات باستثناء الجذر كان خاليا من الصابونيات، وكذلك البذور لاتحتوي على

تانينـات، وأظهـرت مقـاييس الانتشـار لمستخلصـات المورينجـا أنشـطة مضـادة للميكروبـات ضـد *S. aureus, E. coli* بقطر تثبيطي 14.0 ملم و16.3ملم علـى التوالي حيث كـان مستخلص الأوراق أكبر نشاطا ضد الميكروبـات، وشملت دراسـة أخرى لـ(Husnan and Alkahtani, 2016) حول تأثير المستخلص المـائي للمورينجـا أوليفيرا علـى البكتيريـا المسببة للأمـراض فـي المختبر *S. aureus, K. pneumonia, Ps. aeruginosa, B . cereus, Salmonella typhi, E. coli* بأقطار تثبيطية مختلفة تتراوح بين 12.5 – 23.5 ملم وفقا لنوع البكتيريا، حيث أظهر المستخلص المـائي لأوراق المورينجـا نشـاطا مضـاد للميكروبـات ضـد البكتيريـا بتركيـزات مختلفة، ودراسة أخرى (Abbas and Elsharbasy, 2019) في السودان حول النشاط المضـاد للبكتيريـا للمستخلص المـائي والكحـولي لأوراق المورينجـا أوليفيرا ضـد أربـع كائنـات ممرضـة *Ps. aeruginosa, B. cereus, Salmonella typhimurium, E. coli* وكان أعلى تركيز للمستخلص 100 ملغ / مل وأدنى تركيز 12.5 ملـغ /مل، حيث سجل المستخلص المـائي أعلـى نشـاط ضـد بكتيريـا *E.coli* فـي جميـع التركيـزات (100 – 50 – 25 – 12.5) بأقطـار تثبيطيـة (15، 15، 14، 13 ملم) علـى التـوالي، وأقل نشـاط ضـد بكتيريـا *Ps. aeruginosa* بأقطـار تثبيطية (15، 0، 0، 0 ملم) على التوالي، وسجل المستخلص الكحولي أعلى نشاط ضـد *E. coli* بأقطـــار تثبـــيط (15، 14، 13، 10 ملـــم)، *Ps. aeruginosa* (16، 14، 12، 10ملـــم) و*Salmonella typhimurium* (10، 10، 0، 0 ملـــم)، اســـتنتج أن المســـتخلص المـــائي والكحولي لأوراق المورينجا لديه نشاط عالي ضد بكتيريا *E. coli* بحيث لـم يكـن هنـاك اختـلاف بين المضاد والمستخلص.

أهداف الدراسة :

1- الكشف عن المواد الفعالة ذات التأثير المضاد للبكتيريا وإستخلاصها.
2- دراسة التأثير المضاد للبكتيريا لمستخلص اوراق نبات المورينجا أوليفيرا على بعض أنواع البكتيريا الممرضة .
3- دراسة حساسية البكتيريا لبعض المضادات الحيوية .
4- تعيين أقل تركيز مثبط Minimum Inhibitory Concentration (MIC) وأقل تأثير قاتل Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC) لمستخلص المواد الفعالة .
5- إختبار مدى قدرة المستخلصات ذات الفاعلية في دعم المضادات الحيوية فاقدة الفاعلية

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

3- المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1.3- المواد Materials

1.1.3-المواد الكيميائية Chemicals

كحول إيثانولي 95% - كحول ميثانولي 95% - إيثايل أسيتات 95% - هيدروكسيد الصوديوم – كلوريد الحديديك – حمض الهيدروكلوريك – كلوروفورم – هكسان – حمض الخليك.

2.1.3-الأجهزة والمعدات Instruments and equipments

– جهاز المبخر الدوارRatatory evaporator

– جهاز الطرد المركزي نوع Rotofix 32 A

– جهاز التعقيم Autoclave

– ماسح قطني Cotton Swab

– جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV

– إبر التلقيح Loop

– ميزان حساس Analytique Balance

– موقد بنزن Bunsen burner

– حاضنة Incubator

– ورق ترشيح Filter Papier

– أنابيب إختبار Test Tube

– دوارق زجاجية Flasks

– أطباق بتري معقمة Sterile petri dishs

– مسطرة Ruler

– ثاقب فليني Cork borer

– شاش معقم Sterile Gauze

الشكل رقم (6) يبين جهاز المبخر الدوار Ratatory evaporator

3.1.3- الأوساط الزراعية Culture media

Nutrient Agar (NA) الشركة المصنعة Oxoid الولايات المتحدة

Muller Hinton Agar (MHA) الشركة المصنعة Oxoid الولايات المتحدة.

Nutrient Broth (NB) الشركة المصنعة Oxoid الولايات المتحدة.

4.1.3-المضادات الحيوية Antibiotics

جدول (1): المضادات الحيوية المستخدمة .

الرقم NO .	المضادات الحيوية Antibiotics	الرمز Symbol	التركيز Concentration (µg / ml)
1	Ampicillin	AM	10
2	Amoxicillin	AX	30
3	Ciprofloxacin	CIP	5
4	Gentamicin	CN	10
5	Kanamycine	K	30
6	Tetracycline	TE	10
7	Nalidixin	NA	30

2.3- طرائق العمل Methods

1.2.3- جمع العينات النباتية وتهيئتها :

تم جمع أوراق المورينجا أوليفيرا (*Moringa oleifera*) من أحد المزارع في طرابلس (ليبيا) وكانت الأوراق سليمة وغير مصابة وتم تنظيفها وغسلها بالماء المقطر وجففت هوائيا في المختبر في درجة حرارة الغرفة، وطحنت بالمطحنة الكهربائية، ووضعت في أكياس بلاستيكية وخزنت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 درجة مئوية لحين استخدامها .

2.2.3- العزلات الجرثومية :

تم اختيار أنواع من العزلات الجرثومية التي تم الحصول عليها من مختبر الأحياء الدقيقة بكلية الطب البشري _ جامعة طرابلس .

1.2.2.3- أنواع بكتيرية سالبة لصبغة الجرام وهي:

جدول (2) : السلالات البكتيرية السالبة لصبغة جرام.

الرقم NO .	*Klebsiella spp*		*Pseudomonas spp*		*Escherichia coli spp*	
	اسم السلالة	الرمز	اسم السلالة	الرمز	اسم السلالة	الرمز
1	*Klebsiella spp*	*1*	*Pseudomonas spp*	*1*	*E . coli*	*1*
2	*Klebsiella spp*	2	*Pseudomonas spp*	*102*	*E . coli*	4
3	*Klebsiella spp*	*3*	*Pseudomonas spp*	*104*	*E . coli*	9
4	*Klebsiella spp*	*4*	*Pseudomonas spp*	*105*	*E . coli*	20

2.2.2.3- النوع البكتيري موجب لصبغة جرام وهو :

جدول (3) : السلالات البكتيرية الموجبة لصبغة جرام .

الرقم NO .	*Staphylococcus spp*	
	اسم السلالة	الرمز
1	*S. aureus*	1
2	*S. aureus*	2
3	*Staphylococcus spp*	6571
4	*Staphylococcus spp*	13H

3.2.3- إعداد المستخلصات النباتية لأوراق المورينجا أوليفيرا

1.3.2.3- تحضير المستخلص الخام

جهزت 4 قارورات معقمة لكل مستخلص على حده ووزن 5 جم من المورينجا بواسطة الميزان وأضيف إليها 50 مل لكل من (الكحول الميثانولي، الكحول الإيثانولي، إيثيل أسيتات والماء) وتم وضعهم على جهاز الرجاج الكهربائي في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة ورجت جيدا للحصول على المستخلص الخام ، ووضعت بعدها في جهاز الطرد المركزي بسرعة (40 دورة في الدقيقة) لمدة 15 دقيقة ثم رشح المزيج بواسطة ورق ترشيح Whatman No. 1، ووضع في جهاز المبخر الدوارRatatory evaporator عند درجة حرارة 40 م حتى يتم فصل المستخلص النباتي عن الكحول والماء ووضع في أنابيب معقمة وغلفت لحجب الإضاءة عنها وحفظت في الثلاجة على درجة 4 م لحين استخدامها (Balajee *et al*., 2004)

4.2.3- الكشف المبدئي عن المركبات الفعالة في المستخلص الخام

1.4.2.3 - الكشف عن الفلافونويدات (Flavonoids)

أخذ من مستخلص نبات المورينجا أوليفيرا الخام 3 مل وأضيف إلى 10مل من الماء المقطر و1مل من هيدروكسيد الصوديوم NaoH بتركيز 10 % وخلط المزيج بشكل جيد ملاحظة تكون لون أصفر في الخليط يدل على وجود الفلافونويدات (Pinal *et al ., 2014*)

2.4.2.3 - الكشف عن التانينات (Tannins)

أخذ من مستخلص المورينجا أوليفيرا الخام 2 مل ووضع في أنبوبة اختبار وتم غليه برفق لمدة دقيقتين وترك ليبرد ثم أضيف إليه ثلاث قطرات من محلول كلوريد الحديديك تركيز 1% *Ferric chloride* ظهور لون برتقالي دل على وجود *التانينات* (Pinal *et al ., 2014*)

3.4.2.3- الكشف عن القلويدات (Alkaloids)

حضر 10 مل من حامض الهيدروكلوريك HCL تركيز1% ثم أضيف 1مل منه إلى مستخلص المورينجا أوليفيرا في أنبوبة اختبار وسخن الخليط في حمام مائي لمدة 20 دقيقة مع الرج برفق خلال العملية ثم ترك ليبرد ورشح بورق ترشيح *Whatman no 1*، أخذ *1 مل* من الخليط وأضيف إليه قطرتان من *Wagners reagent* ملاحظة تكون لون مصفر مائل للبني دلالة على وجود القلويدات (Pinal *et al*., 2014)

4.4.2.3– الكشف عن الفينولات *(Phenols)*

أضيف 5 مل من مستخلص المورينجا أوليفيرا في 5 مل من الماء المقطر وأضيف إليه قطرات من كلوريد الحديديك (*Neutral ferric chloride*) بتركيز 5% تم ظهور لون أخضر غامق دل على وجود الفينولات**(**Pinal *et al*., 2014)

5.2.3- فصل المركبات الفعالة باستخدام تقنية شرائح الكروماتوجراف

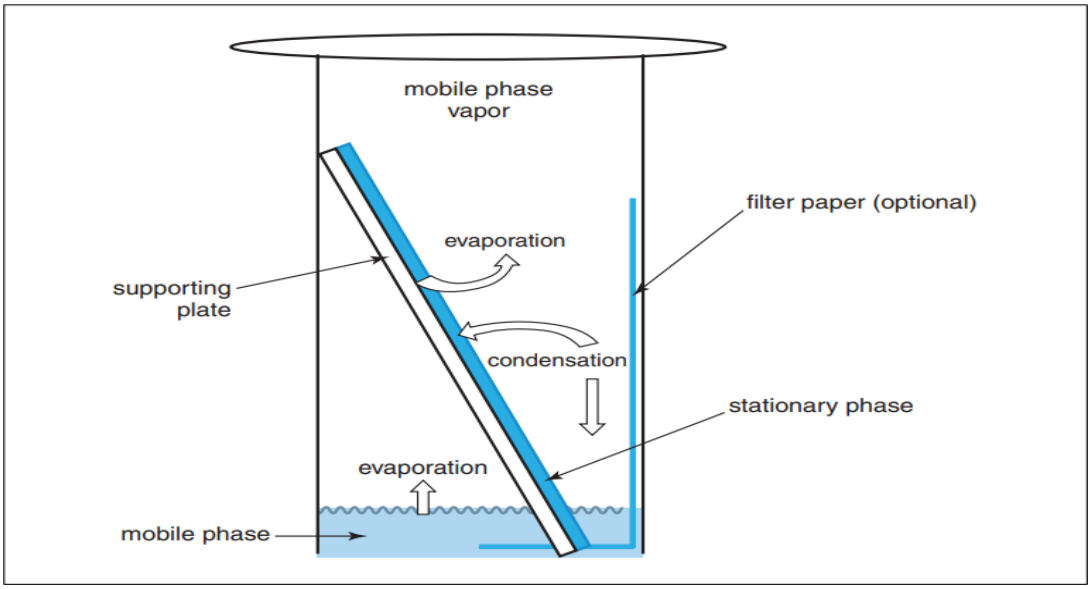
TLC Chromatography

لغرض فصل المركبات الفعالة التي تحتويها المستخلصات النباتية تم استخدام شرائح الكروماتوجراف Thin layer chromatography, Whattman plates, silica gel 60A حيث تم إعداد الشرائح بوضع نقط معلمه (A, B, C, D) رقميا بمسافات متساوية على الخط المرسوم أسفل كل شريحة، وتم نقل المستخلص بواسطة الأنبوبة الشعرية على النقاط المرسومة على الألواح ونقل كمية مناسبة من المستخلصات ووضعها على النقاط المرسومة على الخط أسفل كل شريحة، وضعت كل شريحة بعناية في وعاء خاص، وأضيف إليه المذيبات المعدة للترحيل (Mobile phase) بأنظمة مختلفة كما يلي :

- كلوروفورم، ميثانول، إيثانول بنسب (1 :1: 1)
- كلوروفورم، ميثانول، إيثانول بنسب (0.5 : 2 : 2)
- كلوروفورم، حامض الخليك الثلجي، ميثانول بنسب (4 : 5 : 1)

(Paliwal *et al*., 2011) وضع غطاء على وعاء الترحيل وترك لإتمام عملية الترحيل، بعد انتهاء عملية الترحيل والفصل بوصول المذيب لمسافة مناسبة في أعلى الشريحة تم رفع الشريحة من الوعاء وتجفيفها وفحصها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ثم رشها بمحلول اليود وملاحظة ظهور حزم للمركبات التي تم فصلها، ثم التمييز بين حزم المركبات المنفصلة لكل مستخلص بحساب قيم معامل الإعاقة (Retention Factor RF) values حسب المعادلة التالية :

$$\text{معامل الإعاقة } (\boldsymbol{RF\ values}) = \frac{\text{المسافة المقطوعة بواسطة المذاب}}{\text{المسافة المقطوعة بواسطة المذيب}}$$



شكل رقم (7): فصل المركبات الفعالة باستخدام تقنية شرائح الكروماتوجراف

Cai, L. (2014)

3. 2 . 6- تعيين حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية بإستخدام طريقة الأقراص :

خضعت جميع العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة لاختبار حساسيتها للمضادات الحيوية باتباع طريقة (Bauer *et al.*, 1966)، تم إجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية المذكورة في بند (4.1.3) بطريقة الأقراص لـ Kirby and Bauer باستخدام وسط آجار مولر هنتون Mueller – Hinton Agar (Difco).

كما وصفت بواسطة Clinical laboratory standard institute (CLSI) (Anonymous *et al.*, 2013) وذلك بأخذ 4-5 مستعمرات مفردة نقية من سطح أجار بواسطة ناقل جرثومي loop معقم ووضعها في أنبوب اختبار تحتوي 4 مل من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) ورجت جيداً بحيث تكوّن عتمة مقاربة لأنبوب ماكفرلاند (Macfarland tube) رقم 0.5 التي عندها يكون العدد البكتيري ا×10^8 خلية/مل بعد مرور من 1-2 ساعة زرعت أطباق بتري تحوي وسط Mueller hinton agar بالعالق البكتيري المحضر وتم توزيعه بواسطة ماسحة قطنية (Cotton swab) معقمة على سطح الآجار بعد التخلص من الكميات الزائدة من العالق البكتيري بضغط الماسحة القطنية بجدران أنبوب الاختبار من الداخل ، بعدها تم مسح الأجار من جميع الجهات لكي تتوزع الكمية بالتساوي، واستخدم طبقان لكل عترة جرثومية وتركت الأطباق لتجف لمدة 15-30 دقيقة. بعد ذلك تم وضع أقراص المضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم على سطح الأجار المزروع، استخدم 4 أقراص لكل طبق بينها مسافات متباعدة متساوية بين القرص والأخر وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة 37مْ

لمدة 24-48 ساعة اعتماداً على فترة النمو لكل بكتيريا. (Atlas *et al*, . 1995) تم قياس مناطق التثبيط باستخدام المسطرة وقدرت حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية حسب الجدول التالي: جدول (4).

جدول (4) : يبين تقدير حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية حسب أقطار مناطق التثبيط (CI.SI, 2013)

Name of antibiotic إسم المضاد الحيوي	Sensitivity Result نتيجة الحساسية					
	Disk contentration تركيز محتوي القرص	Zone diameter breakpoints nearest to whole mm نقاط التوقف قطر المنطقة الأقرب إلى(مم) كامله				
		Susceptible (S) حساسة	Intermediate (I) متوسطة الحساسية	Resistant (R) مقاوم	Zone Reading (mm) قراءة المنطقة (مم)	RESULT (S or I or R) النتيجة
Amikacin	30µg	≥17	15-16	≤14		
Ampicillin	25µg	≥17	14-16	≤13		
Vancomycin	30µg	≥23	20-22	≤19		
Cefepime	30µg	≥18	15-17	≤14		
Cefoxitin	30µg	≥18	15-17	≤14		
Ceftazidime	30µg	≥21	18-20	≤17		
Cefuroxime	30µg	≥23	15-22	≤14		
Ciprofloxacin	5µg	≥21	16-20	≤15		
Imipenem	10µg	≥23	20-22	≤19		
Meropenem	10µg	≥23	20-22	≤19		
Piperacillin/ tazobactam	100/10µg	≥21	18-20	≤17		
Amoxicillin	30µg	≥20	-	≤19		
Ampicillin	10µg	≥17	14 - 16	≤13		
Tetracycline	10µg	≥23	20-22	≤19		
Nalidixicacid	30µg	≥23	14-22	≤13		
Kanamycine	30µg	≥17	14-17	≤13		
Gentamicin	10µg	≥17	15-16	≤14		

7.2.3- إختبار التأثير المضاد لمستخلصات اوراق المورينجا أوليفيرا ضد البكتيريا باستخدام طريقة الإنتشار في الحفر Well diffusion methods

تم وضع 20مل من الوسط الغذائي Muller Hinton Agar (MHA) لكل طبق بتري، تركت بعدها الاطباق لمدة (15-30) دقيقة ثم بعد ذلك لقح الوسط بواسطة ماسحة قطنية معقمة Steril swab بالسلالات البكتيرية المعدة للاختبار التي تمت مقارنتها مع المحلول القياسي ماكفرلاند، بعد ذلك تم عمل حفر (Welle) في الوسط الغذائي الملقح بالبكتيريا بواسطة ثاقبة فلين معقمة باللهب بقطر 7 ملم، وبواسطة ماصة دقيقة تم نقل 50 مايكروليتر من كل تركيز من تراكيزات المستخلص النباتي لأوراق المورينجا أوليفيرا(25، 50، 100 ملجم / مل) ووضعها داخل الحفرة، وتم مقارنة أعلى تركيز مثبط لمستخلص المورينجا مع مجموعة من المضادات الحيوية بنفس الطريقة، ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة، بعد ذلك أخذت النتيجة بقياس قطر منطقة التثبيط والتي تمثل منطقة عدم النمو المحيطة بالحفرة بواسطة المسطرة (Bansode and Chavan, 2012)

3. 2. 8- تقدير التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration(MIC) والتركيز القاتل الأدنى Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC)

تم تعيين أقل تركيز تثبيطي (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) لمستخلصات أوراق المورينجا تجاه الأنواع البكتيرية المدروسة كالآتي :

حضرت سلسلة من التراكيز(1.65- 3.12 - 6.25 - 12.56 - 25 – 50- 100) مغ /مل من المستخلصات ذات الفعالية المضادة لنمو البكتيريا، تم إضافة 5 مل من التركيز الاساسي 100 مغ / مل إلى أنبوبة معقمة حاوية على 5 مل من الوسط الزراعي Nutrient broth للحصول على تركيز 50 مغ / مل ونقل حجم 2.5 مل من المزيج (الوسط + المستخلص) إلى أنبوبة أخرى حاوية على 2.5 مل من الوسط السائل بحيث أصبح التركيز 25 مغ /مل وهكذا على التوالي حتى الوصول إلى أقل تركيز 1.65 مغ / مل . بعدها تم تلقيح الأنابيب ذات التركيزات المختلفة من المستخلص بملء ناقل جرثومي من أنابيب الإختبار الحاوية على سلالات البكتيريا المختبرة المقارنة بأنبوب ماكفرلاند (0.5)، وحضنت الأنابيب لمدة 24ساعة بدرجة حرارة 37مْ وسجلت نتائج MIC على أساس ظهور العكارة Turbidity نظريا وعمليا وذلك بالزرع من كل الأنابيب التي لم تظهر فيه عكارة (نمو جرثومي) على أطباق معقمة حاوية على الوسط المغذي Nutrient agar وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24ساعة للتأكد من التركيز الذي لم يحدث فيه نمو جرثومي بحيث يكون أقل تركيز الذي لم يحدث فيه نمو في الأنابيب

وحدث فيه نمو على الأطباق يعتبر MIC، بينما أقل تركيز لم يحدث فيه نمو في الأنابيب وأيضا لم يحدث فيه نمو على الأطباق يعتبر أقل تركيز قاتل MBC أي النمو تم إيقافه أو إعاقته بنسبة 99%(Working party report, 1991).

9.2.3 - دراسة مدى قدرة المستخلصات النباتية في دعم المضادات الحيوية فاقدة الفعالية

العديد من الدراسات التي أجريت حديثا أشارت إلى أن مقترح دمج نواتج طبيعية مع مركبات كيميائية مثل المضادات الحيوية يمكن ان يكون ذو فعالية في دعم تأثير المضادات الحيوية فاقدة الفعالية ضد أنواع مختلفة من البكتيريا المقاومة من خلال مايعرف بالتأثير التشاركي Synergestic effect حيث ان قابلية عمل المواد الفعالة التي تحتويها المستخلصات في العمل التشاركي مع المضادات الحيوية يمكن اعتباره كمسلك جديد للمساعدة في حل مشكلة المقاومة الميكروبية للمضادات الحيوية . (Alkasak, 2022)

وبناءً على ذلك تم إجراء هذه التجربة والتي تم فيها اختبار مدى إمكانية دعم فعالية مضادات حيوية تم اختبارها وتقدير مدى فقدها للتأثير على العزلات المدروسة والتي كانت Tetracycline (TE-10µg) ضد السلالة *Klebsiella spp .2* و Ampicilline (AM-10 µg) ضد السلالة *S. aureus 2* وذلك بوضع قرص من المضاد الحيوي فاقد الفعالية في أنبوبة اختبار تحتوي على حجم 5 مل من المرق المغذي (NB) والمستخلص بتركيز100مغ /مل. زرعت أطباق بتري تحتوي على الوسط المغذي مولر هنتون (MHA) بالبكتيريا المذكورة أعلاه، بعد ذلك صنعت ثلاثة حفر، وضع في الحفرة الأولى المستخلص فقط وفي الثانية الشاهد فقط (وسط غذائي فقط) بينما وضع في الحفرة الثالثة المضاد والمستخلص، تم وضع قرص من المضاد الحيوي ذو الفعالية على مسافة متساوية مع الحفر كشاهد موجب لمقارنة التأثير، تم إجراء هذه التجربة بثلاث مكررات لكل عزلة ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة وتم تسجيل النتائج بقياس أقطار مناطق التثبيط.

10.2.3 - التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام البرنامج الإحصائي (SPSS 27) Statistical Package for Social Science .

الفصل الرابع

النتائـــــــــج

4- النتائج

Results

1.4 - الكشف المبدئي عن المركبات الفعالة لمستخلصات أوراق المورينجا :

يبين الجدول (5) نتائج الكشف المبدئي عن المجموعات الفعالة لمستخلصات أوراق المورينجا باستخدام مذيبات مختلفة (الميثانول، الإيثانول، إيثيل أسيتات ، والماء) .

أوضحت النتائج أن جميع المذيبات المستخدمة كانت فعالة في استخلاص المركبات الفعالة الهامة التي تحتويها أوراق المورينجا (القلويدات، الفلافونيدات، التانينات والفينولات) بنسب مختلفة، تفوق مذيب الإيثانول على جميع المذيبات في استخلاص جميع المركبات الفعالة بنسبة عالية، يليه كل من مذيب إيثيل أسيتات والماء في استخلاص الفلافونيدات والتانينات والفينولات بنسب عالية، بينما القلويدات كانت بنسبة معتدلة بينما إحتوى المستخلص الميثانولي على كل من الفلافونيدات والفينولات بنسبة عالية وكانت القلويدات والتانينات بنسبة معتدلة .

جدول (5) : الكشف المبدئي على المركبات الفعالة لمستخلصات أوراق المورينجا

المذيب المستخدم	القلويدات	الفلافونويدات	التانينات	الفينولات
الميثانول	++	+++	++	+++
الإيثانول	+++	+++	+++	+++
إيثيل أسيتات	++	+++	+++	+++
الماء	++	+++	+++	+++

+++ نسبة عالية

++ نسبة معتدلة

+ نسبة ضعيفة

2.4 – فصل المركبات الفعالة للمستخلص الخام لإوراق المورينجا باستخدام تقنية شرائح الكروماتوجراف :

تم اعتماد الفصل الكروماتوغرافي بواسطة كروماتوغراف الطبقة الرقيقة (شرائح TLC) لتحديد درجة تحرر المركبات الكيميائية الموجودة في مستخلص أوراق المورينجا أوليفيرا، حيث تعتمد هذه الدراسة على الخواص في الكروماتوغرافيا وتتمثل هذه الخواص في اللون الإشعاعي ومعامل الإعاقة RF وعدد النقاط الممثلة للمكونات المفصولة من كل مستخلص

حيث أوضحت النتائج في جدول (6) تباين كبير في فصل المركبات الفعالة عند استخدام أطوار متحركة مختلفة :

1- الطور المتحرك : كلوروفورم، ميثانول ، إيثانول (1 : 1 : 1)

كشفت النتائج عن وجود 4 نقاط للفصل بقيم RF 0.015/0.89/0.92/0.93 في المستخلص الميثانولي، بينما أظهرت 5 نقاط بقيم RF 0.046/0.66/0.83/0.90/0.93 في المستخلص الإيثانولي و4 نقاط فصل لمستخلص إيثيل أسيتات بقيم RF 0.46 /0.50/ 0.56/0.89، أما المستخلص المائي لم تظهر أي نقاط فصل .

2- الطور المتحرك : كلوروفورم، ميثانول، إيثانول (2 : 2 : 0.5)

في هذه الشريحة ظهور 3 نقاط للفصل بقيم RF 0.090 / 0.072 / 0.81 للمستخلص الميثانولي، بينما لم تظهر أي نقاط في المستخلص الإيثانولي وإيثيل أسيتات والمستخلص المائي .

3- الطور المتحرك : ميثانول ، حمض الخليك الثلجي، كلوروفورم (1 : 5 : 4)

ظهور 2 من النقاط بقيم RF 0.45 / 0.78 للمستخلص الميثانولي و3 نقاط للمستخلص ايثيل أسيتات بقيم RF 0.4/0.76/0.83، بينما انعدام وجود أي نقاط في كل من المستخلص الإيثانولي والمائي .

جدول (6) قيم معامل الإعاقة (RF. values) للمركبات الفعالة بمستخلصات أوراق المورينجا المعاملة بتقنية TLC بأطوار متحركة مختلفة .

Mobile phase الطور المتحرك	RF values قيم معامل الإعاقة			
	المستخلص المائي	مستخلص إيثيل أسيتات	المستخلص الإيثانولي	المستخلص الميثانولي
*CH: M: E (1:1:1)	-	0.46 /0.50/ 0.56/0.89	0.046/0.66/0.83/0.90/0.93	0.015/0.89/0.92/0.93
*CH : M : E (2:2:0.5)	-	-	-	0.090 / 0.072 / 0.81
*M : GAA : CH ((1: 5 :4	-	0.4/0.76/0.83	-	0.45 / 0.78

*الكلوروفورم Chloroform (CH) الميثانول Methanol (M) الإيثانول Ethanol (E) حمض الخليك الثلجي (GAA) لاتوجد نقاط (-)

3.4 – اختبار تقدير حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة الأقراص :

1.3.4- اختبار تقدير حساسية سلالات بكتيريا *Pseudomonas* للمضادات الحيوية :

استخدمت طريقة أقراص المضادات الحيوية شائعة الاستعمال لمعرفة فاعليتها على نمو البكتيريا المختبرة، حيث أظهرت النتائج المدونة بالجدول (7) أن جميع سلالات بكتيريا *Pseudomonas* المختبرة *(Pseudo. spp 102, Pseudo. spp104, Pseudo. spp105,* 1) *pseudo. spp* مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستخدمة، فيما عدا المضاد الحيوي Ciprofloxacin (CIP5) الذي كان المضاد الوحيد الفعال ضد جميع السلالات. المضاد الحيوي Gentamicin (CN10) أظهر أيضا فعالية محدودة ضد بعض السلالات حيث كانت السلالة *Pseudo. spp 104* حساسة لهذا المضاد بمنطقة تثبيط 17 مم ومتوسط التأثير على كل من السلالة *Pseudo. spp102* والسلالة *Pseudo. spp 105* بمنطقة تثبيط قطرها 15 مم. بينما السلالة *pseudo. spp* 1 كانت مقاومة لهذا المضاد بمنطقة تثبيط قطرها 14 مم .

جدول (7) : اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Pseudomonas*

السلالات البكتيرية	Gentamicin CN10		Ciprofloxacin CIP5		Amoxicillin AX30		Ampicillin AM10		Nalidixin NA30		Tetracycline TE10		Kanamycin K30	
	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة
Pseudomonas spp102	15	I	35	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Pseudomonas spp104	17	S	40	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Pseudomonas spp105	15	I	30	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Pseudomonas spp 1	14	R	35	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R

2.3.4 - اختبار تقدير حساسية سلالات بكتيريا *Klebsiella* للمضادات الحيوية :

جدول (8) يبين نتائج اختبار سلالات بكتيريا *Klebsiella* (*Kleb. spp 1, Kleb. spp 2, Kleb. spp* 3, *Kleb. spp* 4) تبين أن جميع السلالات كانت مقاومة لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة Kanamycin (K30) Tetracycline (TE10) Amoxicillin(AX30), Ampicillin(AM10) بينما كانت جميعها حساسة للمضادين

الحيــويين (CN10) Gentamicin   (CIP5),   Ciprofloxacin. المضــاد الحيــوي Nalidixin(NA30) كان متوسط التأثير على جميع السلالات المختبرة .

جدول (8) : اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Klebsiella*

السلالات البكتيرية	Gentamicin CN10		Ciprofloxacin CIP5		Amoxicillin AX30		Ampicillin AM10		Nalidixin NA30		Tetracycline TE10		Kanamycin K30	
	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة
Klebsiella spp 1	17	S	35	S	0	R	0	R	18	I	13	R	0	R
Klebsiella spp 2	18	S	30	S	0	R	0	R	17	I	13	R	0	R
Klebsiella spp 3	18	S	33	S	0	R	0	R	18	I	12	R	0	R
Klebsiella spp 4	20	S	35	S	0	R	0	R	18	I	13	R	0	R

3.3.4 - اختبار تقدير حساسية سلالات بكتيريا *Escherichia coli* للمضادات الحيوية :

أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا ***E. coli*** *(E. coli 1, E. coli 4, E. coli 9, E. coli 20)* المبينة بالجدول (9) مقاومة متعددة لأغلب المضـادات الحيويــة المســتخدمة وحساســة فقـط للمضــادين الحيــويين Gentamicin **(**CN10) و(K30) Kanamycin.

جدول (9) : اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Escherichia coli*

السلالات البكتيرية	Gentamicin CN10		Ciprofloxacin CIP5		Amoxicillin AX30		Ampicillin AM10		Nalidixin NA30		Tetracycline TE10		Kanamycin K30	
	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة
E. coli 1	20	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	20	S
E. coli 4	20	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	20	S
E. coli 9	20	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	20	S
E. coli 20	23	S	0	R	0	R	0	0	0	R	0	R	20	S

4.3.4 - اختبار تقدير حساسية سلالات بكتيريا *Staphylococcus* للمضادات الحيوية

عند اختبار سلالات من بكتيريا *Staphylococcus* (*S. aureus 1*, *S. aureus 2*, *Staph. spp 6571*, *Staph. spp 13H)* أظهرت النتائج أن جميع السلالات كانت ذات حساسية عالية لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة [Kanamycin (K30), Tetracycline (TE10) Gentamicin (CN10), Amoxicillin (AX30), Ciprofloxacin (CIP5)] فيما عدا السلالة *S. aureus 2*، التي كانت مقاومة لكلا المضادين Ampicillin (AM10) Nalidixin (NA30)، والعزلة *Staph. spp13H* كانت مقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin AM10 جدول (10) .

جدول (10) : اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Staphylococcus*

السلالات البكتيرية	Gentamicin CN10		Ciprofloxacin CIP5		Amoxicillin AX30		Ampicillin AM10		Nalidixin NA30		Tetracycline TE10		Kanamycin K30	
	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة	قطر المنطقة (مم)	النتيجة
S . aureus 1	23	S	30	S	43	S	15	I	15	I	28	S	25	S
S . aureus 2	23	S	30	S	44	S	12	R	13	R	30	S	20	S
Staph spp. 6571	20	S	32	S	43	S	20	S	15	I	30	S	23	S
Staph spp. 13H	20	S	30	S	42	S	12	R	15	I	28	S	24	S

4.4 – اختبار التأثير المضاد للمستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا أوليفيرا ضد البكتيريا :

1.4.4- التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Pseudomonas* :

أظهرت النتائج المدونة بالجدول رقم (11) أن المستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا عند تركيز 100 مجم/ مل تأثير ملحوظ على سلالات بكتيريا *Pseudomonas* المختبرة *(Pseudo. spp 102, Pseudo. spp 104, Pseudo. spp 105, pseudo. spp1)* ولكن بأقل تأثير بفروق في مستوى المعنوية (p-value 0.001) لصالح المضاد الحيوي المستخدم Ciprofloxacin الذي اعتبر شاهد قياسي لتقييم التأثير، باعتباره المضاد الحيوي الذي كان له التأثير الأعلى على البكتيريا المختبرة. كان أعلى تأثير مثبط لمستخلص أوراق المورينجا ضد

السلالة *Pseudo. spp105*بنسبة تـأثير 78.7% وأقل تـأثير كـان علـى السـلالة *Pseudo. spp 104* بنسبة تأثير 57.2% وبمتوسط عام لنسبة التأثير 66.6% مقارنة بالشاهد لجميع السلالات .

جدول (11) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Ciprofloxacin لسلالات بكتيريا *Pseudomonas* :

السلالات البكتيرية	المتوسط (مم)(Mean) ± الانحراف المعياري (sd)		مستوى المعنوية p-value	النسبة المئوية للتأثير %
	الشاهد (CIP5) المضاد	المستخلص		
Pseudomonas spp 1	0.00±30.00	0.577±20.33	*0.001	67.8
Pseudomonas spp 102	0.58±33.33	0.00±22.00	*0.001	66.0
Pseudomonas spp 104	0.00±35.00	1.00±20.00	*0.001	57.2
Pseudomonas spp 105	0.00±25.00	0.58±19.67	*0.004	78.7
المتوسط العام	0.145±30.83	1.087±20.5	*0.001	66.5

***فروق معنوية ذات دلالة إحصائية**

2.4.4- التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Klebsiella*:

أظهـرت النتـائج المدونـة بالجـدول رقـم (12) وجـود فـروق معنويـة لصـالح المضـاد (بمسـتوى معنويـة 0.005 - 0.001) فـي متوسـطات أقطـار منـاطق التثبـيط لنمـو سـلالات مـن البكتيريا المختبرة (***Klebsiella*** *(Kleb. spp 1, Kleb. spp 2, Kleb. spp 3, Kleb. spp 4* تحت تأثير مستخلص أوراق المورينجا، الذي كـان أقل تـأثيرا مـن المضـاد الحيـوي **(**CN10) Gentamicin المستخدم على نفس النوع من البكتيريا، حيث كان أعلى تـأثير لمستخلص أوراق المورينجا سجل ضد بكتيريا *Kleb. spp* 2 بنسبة تأثير 84.43% وأقل تأثير سجل ضد بكتيريـا *Kleb. spp 3* بنسبة تأثير 59.79% مقارنة بالمضاد.

جدول (12): متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Gentamicin (GN10) لسلالات بكتيريا *Klebsiella* :

السلالات البكتيرية	المتوسط (مم)(Mean) ± الانحراف المعياري (sd)		مستوى المعنوية p-value	النسبة المئوية للتأثير%
	المضاد الشاهد(CN10)	المستخلص		
Klebsiella spp 1	0.00±34.00	0.58±22.33	*0.001	65.68
Klebsiella spp 2	0.00±30.00	0.58±25.33	*0.005	84.43
Klebsiella spp 3	0.00±34.00	0.58±20.33	*0.001	59.75
Klebsiella spp 4	0.00±35.00	0.58±22.67	*0.001	64.77
المتوسط العام	0.00 ± 33.25	0.58±22.67	*0.001	68.18

*فروق معنوية ذات دلالة إحصائية.

3.4.4-التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Escherichia .coli* :

كمـا أظهـرت النتـائج المدونـة بالجـدول رقـم (13) أن المسـتخلص الميثـانولي لأوراق المورينجا تأثير مثبط ملحوظ ضد نمو سلالات بكتيريا ***E.coli*** (*E.coli 9 E.coli 20,E.coli 1, E.coli 4,*) وكان مقارب لتأثيرالمضاد الحيوي Kanamycin (K30) عند نفس النوع من البكتيريا، حيث بلغ المتوسط العام لنسبة التأثير 93.75% مقارنة بالمضاد وكان أعلى تأثير مثبط لمستخلص أوراق المورينجا سجل ضد السلالات *E.coli 1, E .coli 20, E.coli 9*بنسب تأثير 98.43%، 98.36%، 95.24% على التوالي بدون فروق معنوية ذات دلالة إحصائية (0.742 – 0.184) p-value مقارنة بالمضاد يليها السلالة *E.coli 4*بنسبة تأثيرأقل بلغت 84.86%.

جدول (13): متوسطات أقطار مناطق التثبيط لمستخلص الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Kanamycin K30 لسلالات بكتيريا *Escherichia .coli*

السلالات البكتيرية	المتوسط (مم)(Mean) ± الانحراف المعياري (sd)		مستوى المعنوية p-value	النسبة المئوية للتأثير%
	الشاهد (K30) المضاد	المستخلص		
E.coli 1	1.15 ±20.67	0.58±20.33	0.742	98.36
E.coli 4	0.00 ±22.00	1.15±18.67	*0.038	84.86
E.coli 9	1.15 ± 21.33	0.00±20.00	0.184	95.24
E.coli 20	0.58 ±21.67	1.15±21.33	0.423	98.43
المتوسط العام	0.90 21.42 ±	1.24±20.08	*0.015	93.74

***فروق معنوية ذات دلالة إحصائية.**

4.4.4- التأثير المضاد للمستخلص ضد سلالات بكتيريا *Staphylococcus*:

كما أظهرت النتائج المدونة بالجدول رقم (14) أن لمستخلص أوراق المورينجا فاعلية ملحوظة على تثبيط نمو جميع سلالات بكتيريا ***Staphylococcus*** (*S. aureus 1, S. aureus 2, Staph. spp.6571, Staph. spp 13H*)) بنسبة تأثير أقل بلغت 64.4 % بفارق معنوي ذو دلالة إحصائية لصالح المضاد الحيوي المستخدم Amoxicillin(AX30) (الشاهد). أعلى تأثير مثبط لمستخلص أوراق المورينجا سجل ضد السلالة *Staph. spp 6571* بنسبة تأثير 82.2 % وأقل تأثير مثبط سجل ضد السلالة 2 *S. aureus* *بنسبة* تأثير 53.3 % مقارنة بالمضاد .

جدول (14) : متوسطات أقطار مناطق التثبيط لمستخلص الخام لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Amoxicillin AX30 لسلالات بكتيريا *Staphylococcus* :

السلالات البكتيرية	المتوسط (مم)(Mean) ± الانحراف المعياري (sd)		مستوى المعنوية p-value	النسبة المئوية للتأثير%
	الشاهد(AX30) المضاد	المستخلص		
S . aureus 1	0.58±42.6	0.58±24.33	*0.001	57.0
S . aureus 2	0.00±40.00	0.58±21.33	*0.000	53.3
Staph. spp 6571	0.58±35.67	1.15±29.33	*0.019	82.2
Staph. spp 13H	0.00±35.00	1.15±23.67	*0.003	67.6
المتوسط العام	3.31 ±38.33	3.14 ±24.67	*0.001	64.4

***فروق معنوية ذات دلالة إحصائية.**

5.4 - تقدير التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration(MIC) والتركيز القاتل الأدنى Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC) لمستخلص أوراق المورينجا أوليفيرا:

بينت نتائج جدول (15) تباين في حساسية سلالات الأنواع المختلفة من البكتيريا المختبرة للتأثير المثبط MIC والتأثير القاتل MBC للمستخلص الميثانولي الخام لأوراق المورينجا عند اختبار فعاليته باستخدام سلسلة تراكيز مختلفة (100، 50، 25، 12.5، 6.25 ملجرام / مل) المحضرة من التركيز الأصلي للمستخلص . حيث تطلبت سلالات بكتيريا *E.coli* التركيزات الأعلى 50 ملجم / مل، 100 ملجم / مل لتحقيق أقل تركيز مثبط MIC وأقل تركيز قاتلMBC على التوالي، بينما كانت سلالات بكتيريا *Staphylococcus* الأكثر حساسية لتأثير المستخلص بتركيز 12.5 ملجرام /مل و25 ملجرام /مل لأقل تأثير مثبط وقاتل على التوالي .

تطلبت سلالات بكتيريا *Pseudomonas* وسلالات بكتيريا *Klebsiella* تركيزات أقل من بكتيريا *E.coli* حيث كان التركيز 25ملجم / مل كافي لتثبيط نمو بكتيريا*Klebsiella* و50 ملجرام / مل ليكون أقل تركيز قاتل بينما كان هذا التركيز (50 ملجرام / مل) التركيز المثبط والقاتل لسلالات بكتيريا*Pseudomonas* .

جدول (15) يوضح أقل تركيز مثبط (MIC) وأقل تركيز قاتل (MBC) لمستخلص أوراق المورينجا ضد سلالات بكتيريا *Pseudomonas, Klebsilla, Escherichia coli , Staphylococcus*

السلالات البكتيرية	التركيز المثبط الأدنى(MIC) mg/ml	التركيز القاتل الأدنى (MBC) mg/ml
S. aureus 1	12.5	25
S . aureus 2	12.5	25
Staphylococcus spp 13H	12.5	25
Staphylococcus spp 6571	12.5	25
Klebsiella spp 1	25	50
Klebsiella spp 2	25	50
Klebsiella spp 3	25	50
Klebsiella spp 4	25	50
Pseudomonas spp 1	50	50
Pseudomonas spp 102	50	50
Pseudomonas spp 104	50	50
Pseudomonas spp.105	50	50
E. coli 1	50	100
E. coli 4	50	100
E. coli 9	50	100
E. coli 20	50	100

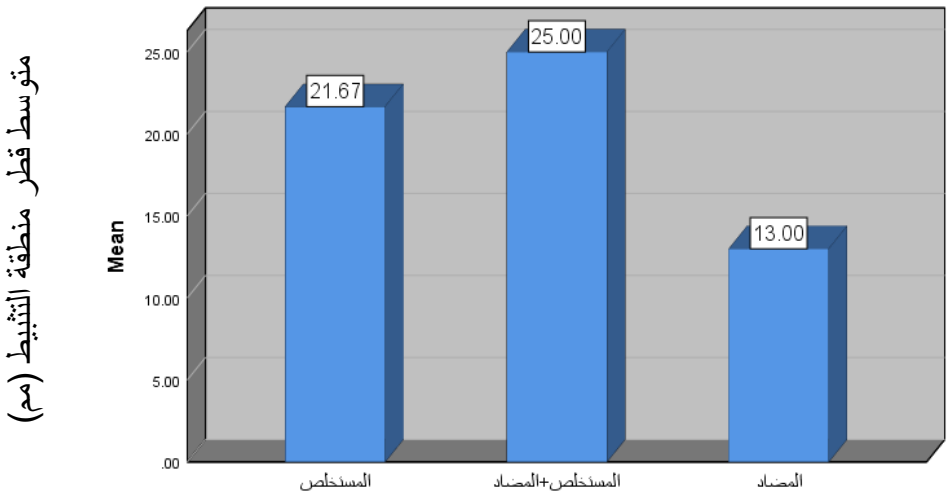
6.4 - دراسة مدى قدرة المستخلصات النباتية في دعم المضادات الحيوية فاقدة الفعالية :

أوضحت نتائج الشكل (8 - 9) إختبار دمج نواتج طبيعية أي المستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا لدعم فاعلية المضادات الحيوية فاقدة الفاعلية أو ذات الفاعلية ضعيفة التأثيربفعل ألية التأثير التشاركي (Synergistic activity) على العزلات البكتيرية المدروسة *S. aureus* 2 و*Klebsiella spp 2* .

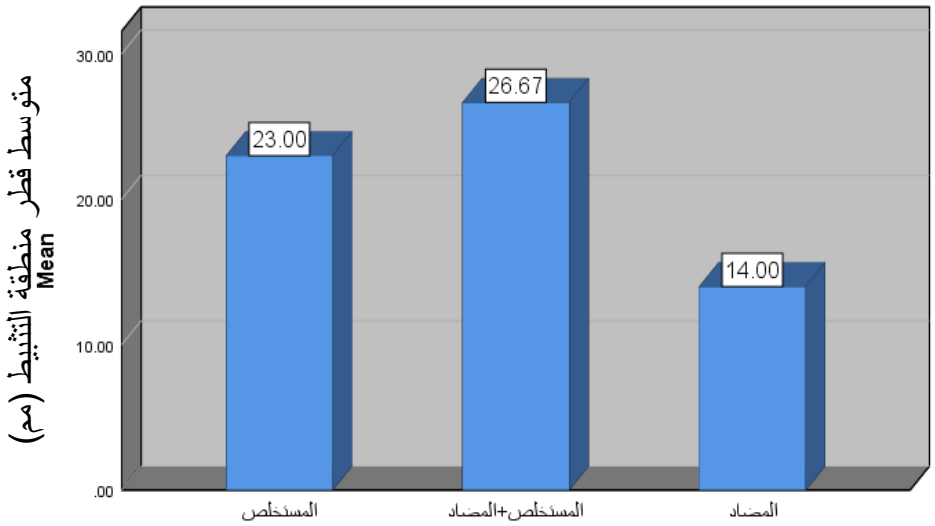
أظهر المضاد الحيوي Ampicillin(AM10) تأثير ضعيف ضد السلالة البكتيرية 2 *S. aureus*. بمتوسط قطر منطقة تثبيط بلغت 13مم مقارنة بالمستخلص الذي بلغت منطقة التثبيط فيه 22مم وعند دمج كل من المضاد الحيوي والمستخلص معاً سجلت منطقة التثبيط زيادة بفروق معنوي ذات دلالة إحصائية لصالح المستخلص + المضاد (p-value 0.001) حيث بلغت منطقة التثبيط 25مم مما يدل على ان عملية الدمج أدت إلى دعم لفاعلية المضاد بنسبة 48% .

أما بالنسبة للسلالة البكتيرية *Klebsilla spp 2* كان قطر منطقة التثبيط عند استخدام المضاد الحيوي Tetracycline (TE10) 14مم مقارنة بالمستخلص الذي أعطى منطقة تثبيط أعلى بقطر 23مم وعند دمج المستخلص مع المضاد ازداد قطر منطقة التثبيط زيادة ملحوظة

بفروق معنوية ذات دلالة إحصائية لصالح المستخلص + المضاد (p-value 0.001) لتبلغ 26.67 مم هذه الزيادة تؤشر إلى حدوث حفز لفاعلية المضاد بنسبة 48.15 % عند دمجه مع المستخلص مقارنة بتأثير المضاد منفرداً.



شكل (8) : متوسطات أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد Ampicillin (AM10) والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus*2



شكل (9) : متوسطات أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد Tetracycline (TE10) والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية *Klebsilla spp.*2

الفصل الخامس

المناقشـــــــــــــة

5 - المناقشة

Discussion

نظرا للاستخدام المفرط للمضادات الحيوية المستخدمة كعلاج للعديد من الأمراض الميكروبية المعدية، وبروز ظاهرة مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية وتطورها للحد الذي يشكل خطورة كبرى على كل من المصاب والمعالج ، بالإضافة إلى ما يتطلبه هذا الأمر من خسائر مادية لمعالجته، فأصبح من الضروري البحث عن بدائل آمنة، ولعل أبرزها كان في الاتجاه إلى الطبيعة الأم، التي تحوي العديد من البدائل، وإحداها اللجوء إلى استخدام النباتات لما تحويه من مواد فعالة لها قدرة علاجية استخدمها الإنسان منذ القدم، وتمكن من خلالها من علاج العديد من الأمراض .

لذلك تم في هذه الرسالة اختيار نبات المورينجا أوليفيرا ذي القيمة الطبية العالية (Paliwal *et al*., 2011; Fahey, 2005)، والذي عُدَ أفضل النباتات التي لها مدى واسع في التطبيقات الطبية (Vinodini *et al*., 2014) ،حيث استخدمت أجزاؤها المختلفة بشكل واسع كغذاء، ولعلاج العديد من الأمراض المختلفة (Krishnamurthy *et al*., 2015) .

لدراسة التأثير المضاد للبكتيريا لهذا النبات تم اختيار أحد أجزاء هذا النبات، والمتمثل في الأوراق، حيث خضعت للعديد من الاختبارات، والتي كان أولها الاستخلاص بمذيبات مختلفة (ميثانول، إيثانول، إيثيل أسيتات والماء) والكشف المبدئي عن مركبات الأيض الثانوي الفعالة التي تحتويها المستخلصات . أظهرت النتائج أن جميع المذيبات المستخدمة (الميثانول، الإيثانول، إيثيل أسيتات والماء) كانت فعالة في استخلاص المركبات الفعالة التي تحتويها أوراق نبات المورينجا، ولكن بتركيزات مختلفة نسبياً ،ويرجع ذلك لعدة أسباب، أهمها تواجد المركب المراد استخلاصه، وقدرة المذيب على الاستخلاص .

من خلال الكشف المبدئي تبين احتواء جميع المستخلصات على المركبات الفعالة الرئيسية، والمتمثلة في كل من القلويدات، الفينولات، الفلافونيدات والتانينات وهذا يتفق مع العديد من الباحثين الذين توصلو لنفس النتائج (Gupta *et al*., 2018; Idris and Abubakar, 2016; Abalaka *et al*., 2012) بينت النتائج أن الفلافونيدات والفينولات (باعتبارها من المركبات الرئيسية المتواجدة طبيعياً في النباتات الطبية (Abdulaziz *et al*., 2015) كانت الأكثر وفرة في الأوراق، تليها التانينات، وهذا يتفق مع التحليل الكيميائي لـ (Mayakrishnan *et al*., 2018; Gupta *et al*., 2018)، الذين اشاروا

إلى وفرة هذه المركبات في أوراق نبات المورينجا، مقارنة بأجزاء أخرى من النبات كالأزهار، والبذور، والجذور .

استخلاص مركبات معينة بتراكيز معينة يعتمد اعتماد كبير على المذيب المستخدم، فكمية المركبات الفينولية (الفينولات والفلافونيدات) تتعلق بقطبية المذيب المستعمل في الاستخلاص، لذلك فإن التركيزات العالية من المركبات الفينولية تكون نتيجة الذوبانية العالية لها في المذيبات القطبية (Ydjedd *et al*., 2017) .

للمزيد من المعلومات حول احتواء مستخلصات أوراق نبات المورينجا على المركبات الفعالة، تم استخدام تقنية شرائح الكروماتوجراف لفصل المركبات باستخدام تركيبات من مذيبات مختلفة ، لتكوين أطوار متحركة مختلفة.

من خلال النتائج المتحصل عليها تبين أن المستخلصات كانت غنية بالمركبات المختلفة الرئيسية منها، والتي تم الكشف عنها مبدئياً مع احتمالية وجود مركبات أخرى يمكن أن تكون مشتقات لتلك المركبات . المستخلص الميثانولي كان الأكثر احتواء على المركبات، والتي ظهرت في جميع الأطوار المستخدمة وكان ذلك سببا في اختياره لإجراء بقية الاختبارات التالية .

لتقدير حساسية البكتيريا المستخدمة في هذه الرسالة للمضادات الحيوية، خضعت جميع سلالات الأنواع البكتيرية المختلفة *(S. aureus, Pseudomonas spp, Klebsilla spp, E.coli)* لاختبار الحساسية ضد بعض الأنواع من المضادات الحيوية شائعة الإستخدام، نتائج هذه الدراسة بينت وجود تباين بين الأنواع المختلفة في حساسيتها للمضادات الحيوية المستعملة بين مقاوم وحساس، ولكن عامل المقاومة كان هو الأكثر ظهورا بين سلالات أغلب الأنواع .

حيث أظهرجميع سلالات *Pseudomonas spp* ،وبكتيريا *E.coli* ، و *Klebsilla spp* مقاومة متعددة لأغلب المضادات الحيوية المستخدمة وحساسة فقط لـ Gentamicin(CN10) لجميع الأنواع، بالإضافة ل Kanamycin (K30) بالنسبة لبكتيريا *E.coli* و Ciprofloxacin(CIP5) بالنسبة لبكتيريا *Klebsilla spp*، وبكتيريا *Pseudomonas* بخلاف سلالات بكتيريا *S. aureus* التي أظهرت حساسية لغالبية المضادات المستخدمة في الدراسة ربما يرجع سبب مشاهدة هذه المقاومة للمضادات الحيوية، بالنسبة للسلالات المستخدمة في هذه الدراسة لكونها سلالات تم الحصول عليها من بنك حفظ السلالات البكتيرية بكلية الطب البشري حيث تم عزلها من حالات مرضية يمكن أن تكون معالجة بنفس المضادات الحيوية لذلك هناك احتمالية اكتساب مقاومة ضدها، وخاصة إذا ما تم استخدامها بطريقة خاطئة من قبل المرضى .

نتائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج الباحثين (Abbas and Elsharbasy, 2019) في اختبار حساسية أربعة أنواع من البكتيريا *Ps. aeruginosa, E.coli, B.cereus, Salmonella typhimurium.* لخمس مضادات حيوية ، فكان أكثر المضادات الحيوية فاعلية سجل عند المضاد Ciprofloxacin (5µg) في حين أقل المضادات الحيوية فاعلية سجل عند المضاد Tetracycline(25 µg)، وكذلك نتائج (Eremwanarue and Shittu, 2018) عند اختبارحساسية 3 أنواع من البكتيريا (*E. coli* ، *Ps .aeruginosa* ، *S. aureus*) لـ 8 مضادات حيوية ، حيث كانت *S. aureus* مقاومة ل 6 مضادات حيوية ، وحساسة للمضادين Gentamicin وOfloxacin، وكانت *Ps .aeruginosa* مقاومة ل 5 مضادات حيوية، وحساسة للمضاد الحيوي Ofloxacin ،أما *E . coli* فكانت مقاومة ل7 مضادات حيوية .

بخصوص نتائج هذه الدراسة للتأثير المضاد للبكتيريا للمستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا عند استخدامه بتركيز100 مغ/مل، تبين أن هناك تأثيراً ملحوظاً على نمو جميع سلالات الأنواع البكتيرية المستخدمة، سواء الموجبة منها أو السالبة لصبغة جرام، وهذا يتضح جلياً من خلال متوسطات أقطار مناطق التثبيط ،التي تراوحت ما بين (20.5±1.087 – 24.67±3.14مم) حيث كان التأثيرالأعلى ضد سلالات بكتيريا *Staphylococcus* الموجبة لصبغة جرام، والتأثير الأقل على سلالات البكتيريا السالبة لصبغة جرام*Pseudomonas* في حين احتلت كل من سلالات بكتيريا *E. coli* و*Klebsilla* موقعاً متوسطاً بمتوسط أقطار بلغت *20.8*± 1.24مم و22.63 ± 0.58 مم على التوالي .

هذه النتائج تتفق مع نتائج الباحثين (Eremwanarue and Shittu, 2018) اللذين وجدوا أن مستخلصات أوراق المورينجا (الميثانول، الكلوروفورم، الماء) أظهرت مستويات مختلفة من النشاط المضاد للبكتيريا عند تراكيز (6.25، 12.5، 25، 50، 100 مغ/مل)، وسجلت أعلى مناطق التثبيط عند تركيز 100 مغ / مل .

وكذلك نتائج البحث ل (Abbas and Elsharbasy, (2019،الذي درسا فيه النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص المائي والكحولي لأوراق المورينجا عند تركيز 12.5، 25، 50، 100 مغ /مل، ضد أربعة أنواع من البكتيريا ، حيث سجل أعلى نشاط ضد بكتيريا *E . coli* في جميع التراكيز، وأقل نشاط ضد بكتيريا *Pseudomonas* .

نتائج هذه الدراسة تتفق أيضاً مع نتائج كل من Bukar *et al*., (2010) ; Abubakar and usman, (2016) الذين درسوا التأثير المضاد للبكتيريا للمستخلص الميثانولي والإيثانولي لأوراق نبات المورينجا النامي في النيجر في الدراسة الأولى، ونيجيريا في الدراسة الثانية، في كون أن كلا الدراستين توصلتا إلى أن المستخلصات المستخدمة كانت أكثر نشاطاً ضد النوعين

E. coli و *S. aureus*، ولكن تختلف عن هذه الدراسة في قوة تأثير المستخلص، حيث أعطت مناطق تثبيط بلغت 12، 10مم في الدراسة الأولى و11، 8مم ، بالنسبة للدراسة الثانية، الذي اعتبر تأثيراً متوسط ضد هذين النوعين من البكتيريا، وربما يرجع ذلك إلى التركيز المستخدم، أو الظروف البيئية لنمو النبات .

لتقييم قوة تأثير وكفاءة المستخلص الميثانولي عند تركيز 100 مغ / مل ضد جميع السلالات البكتيرية المختلفة، تمت مقارنة تأثير المستخلص مع تأثير مضاد حيوي فعال ومؤثر، تم اختياره بعد دراسة حساسية سلالات الأنواع البكتيرية المختلفة لبعض المضادات الحيوية، حيث استخدم كل من Ciprofloxacin (CIP5) ضد سلالات بكتيريا *Pseudomonas* ، والمضاد الحيوي Gentamicin(CN10) ضد سلالات بكتيريا *Klebsilla*، والمضاد الحيوي Kanamycin (K30) ضد سلالات بكتيريا *E . coli* ، والمضاد الحيوي Amoxicillin(AX30) ضد سلالات بكتيريا *Staphylococcus* ،كل منهم كشاهد قياسي موجب لتقييم قوة وكفاءة المستخلص .

نتائج هذه الدراسة أوضحت مسبقاً أن للمستخلص تأثيراً ملحوظاً على جميع السلالات البكتيرية المدروسة، ولكن عند مقارنة نسبة تأثير المستخلص بنسبة تأثير المضاد الحيوي، يتضح أنه أقل تأثيراً بفارق معنوي ذي دلالة إحصائية P.value = 0.001, 0.015، حيث إن نسبة تأثير المستخلص مقارنة بنسبة تأثير المضاد بلغت حوالي 64.4%، 66.5%، 68.18% ضد كل من سلالات بكتيريا *Staphylococcus, Pseudomonas* و*Klebsilla* ،على التوالي خلاف نسبة تأثير المستخلص ضد سلالات بكتيريا *E . coli* ، والتي كانت مقاربة لنسبة تأثير المضاد بقيمة بلغت 93.74%. النسب المشار إليها أعلاه لتأثير المستخلص مقارنة بالمضاد تعد أقل من المضادات المستخدمة، ولكن هذا التأثير للمستخلص يمثل التركيز المستخدم 100 مغ/مل، ربما ترتفع نسبة التأثير بزيادة التركيز؛ استناداً لبعض البحاث الذين لاحظوا بأن تأثير المستخلصات المضادة للميكروبات له علاقة طردية مع التركيز(الدوغجي وآخرون، 2015 :العباسي، 2016) إضافة إلى ذلك فإن المستخلص المستخدم عبارة عن مستخلص خام منقى جزئياً، أي هناك احتمالية إعاقة للتأثير نتيجة وجود مركبات أخرى غير المركبات الفعالة، وهناك عامل مهم آخر وهو أن المضادات الحيوية الفعالة التي أثبتت تأثيرها على هذه سلالات تصبح لاحقا فاقدة للفاعلية شأنها شأن المضادات الأخرى في حالة تكوين مقاومة ضدها .

نتائج هذه الدراسة المتعلقة بتقدير أقل تركيز مثبط (MIC) وأقل تركيز قاتل (MBC) للمستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا، أكدت النتائج المتحصل عليها مسبقاً، والتي بينت أن فعالية المستخلص كانت أعلى ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام ،منها على البكتيريا السالبة

لصبغة جرام حيث تطلب تثبيط النمو، وتحقيق أقل تركيز مثبط، والقضاء التام على البكتيريا وتحقيق أقل تركيز قاتل إلى أقل التركيزات (MIC = 12.5 وMBC = 25 مغ/مل) بالنسبة لبكتيريا *Staphylococcus* الموجبة لصبغة جرام في حين احتاجت سلالات البكتيريا السالبة لصبغة جرام للتركيزات الأعلى (MIC = 25- 50 مغ/مل – MBC = 50-100 مغ/مل).

نتائج هذه الدراسة تتوافق في أفضلية تأثير المستخلص على البكتيريا مع نتائج دراسة Kumar *et al.*, (2012)، التي تبين من خلالها فعالية المستخلص الميثانولي على بكتيريا *S. aureus* بمنطقة تثبيط بلغت 23.6 ± 1.15مم وتركيز مثبط بقيمة 7.4 مغ /مل .

وكذلك دراسة Seleshe and Kang, (2019) اللذين وجدا أن هناك فعالية للمستخلص الميثانولي على بكتيريا *Klebsilla*، بمنطقة تثبيط بلغت 18.25 واحتياج البكتيريا لتركيز عالٍ بلغ 250مغ/مل لتحقيق أقل تركيز مثبط MIC.

لدراسة إمكانية دعم فعالية المضادات الحيوية فاقدة الفعالية، نتيجة لعامل المقاومة، من خلال دمجها مع مستخلصات ذات تأثير مضاد للبكتيريا اعتماداً على آلية النشاط التشاركي (Synergistic activity) أجريت هذه التجربة على عزلتين من البكتيريا تحت الدراسة ، إحداهما موجبة لصبغة جرام (*S. aureus* 2) ،والأخرى سالبة (*Klebsilla spp* 2).

النتائج المتحصل عليها كانت واعدة ، حيث بينت أنه خلال عملية دمج المستخلص مع المضاد حدثت زيادة ملحوظة في تأثير المضاد بفروق معنوية ذات دلالة إحصائية، وبدعم لتأثير المضاد بنسبة بلغت قرابة 48% لكلا المضادين (AM10) Ampicillin ضد السلالة (*S. aureus* 2) و Tetracycline (TE10) ضد بكتيريا (*Klebsilla spp*2).

على الرغم من أن عدداً قليلاً من الدراسات التي أشارت إلى أن هناك تحفيزاً للعوامل المضادة للميكروبات عند دمجها مع المستخلصات الخام (Adwan and Mhanna, 2008)، إلا أن عدداً من الدراسات السابقة، بالإضافة لنتائج هذه الدراسة ، أكدت وجود تحفيز ملحوظ حدث عند دمج المستخلص مع المضاد الحيوي فاقد الفعالية ،الذي يرجح فرضية النشاط التشاركي بين العاملين (المضاد + المستخلص) ،والذي أدى بشكل واضح وجلي إلى ارتفاع في نسبة التأثير المضاد للبكتيريا ، من خلال الزيادة الملحوظة في أقطار مناطق التثبيط.

نتائج هذه الدراسة تتوافق مع عدد من الدراسات التي لاحظت أيضاً زيادة في التأثير المضاد للبكتيريا عند دمج نواتج طبيعية من عدة مصادر متنوعة ، من بينها النباتية ، والطحالب، كالدراسة التي قام بها (Jouad *et al.*, 2015)عند دمج مستخلصات عدد من النباتات (الشيح *Artemia herb –albo*، السرول *Eucalyptus camaldulensis*، أم كلثوم *Lantana cammara* والثوم *Allium sativum*)

مستخلصة بمذيبات مختلفة (الإيثانول، الميثانـــول والمـــاء) ضد بكتيريا *S.aureus E. coli*, *Ps.aeruginosa* مع عدد 18 مضاداً حيوياً.

وكذلك دراسة (Haroun and Alkayali, 2016)،التي أوضحت أيضاً وجود زيادة في التأثير المضاد عند دمج مستخلصات مختلفة من نبات البراري *Thmbra spicata* مع عدد من المضادات الحيوية ذات التأثيرالمضاد بآليات مختلفة، ضد أنواع مختلفة من البكتيريا، وكذلك بينت الدراسة أن أعلى تحفيز للتأثيركان (من 8 إلى 128 ضعفاً)،عند دمج المستخلص مع المضاد الحيوي Cefataxime ضد بكتيريا *S. aureus* .

التحفيز الحاصل في التأثير المضاد للبكتيريا عند دمج المضادات الحيوية مع المستخلصات تمت مشاهدتها في العديد من الدراسات التي استخدمت مستخلصات محضرة من الطحالب، ومن بينها الدراسة التي قام بها (Halee *et al.*, 2014) ،عند دمج مركب Phycorotannins المستخلص من الطحالب البنية مع بعض المضادات الحيوية التجارية، ضد البكتيريا المسببة لمرض حب الشباب acne- causing bacteria، والدراسة التي قام بها (Michoi *et al.*, 2015) عند دمج المركب Fucoidan،المستخلص من الطحالب البنية مع المضـــاد الحيـــوي Ampicillin ،أو Oxicillin ضـــد بكتيريـــا المكـــورات العنقوديـــة المقاومة للميثاسلين (MRSA) Methicillin – resistant *S.aureus* ، وحديثا دراسة (Nafis *et al.*, 2021) عند دمج زيوت أساسية مستخلصة من الطحالب البحرية مع مضادات معروفة مثل Ciprofloxacin وFluconazole ، ضد بكتيريا *S.aureus* ،وكذلك دراسة (Alkasak, 2022) عند دمج مستخلصات من الطحالب مع المضاد الحيوي فاقد الفعالية Amoxcillin، ضد بكتيريا (MRSA) ، بغض النظر عن نوع المستخلص أو نوع البكتيريا المستخدمة، توصلت جميع الدراسات المذكورة وكذلك هذه الدراسة لمشاهدة وجود تحفيز ملحوظ لتأثير العديد من المضادات الحيوية المختلفة وخاصة تلك الفاقدة للفعالية، الأمر الذي أدى لوصول الباحثين السابقين وكذلك هذه الدراسة إلى الاستنتاج الذي يرجح فرضية النشاط التشاركي (Synergistic activity) ،الذي يمكن أن يحصل بين كل من المستخلص والمضاد، والذي تكون محصلته حفز أو زيادة في التأثير المضاد للبكتيريا .

من خلال النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة، يمكن استنتاج أن لمستخلص أوراق المورينجا تأثيراً ملحوظاً في القضاء على بعض أنواع البكتيريا الممرضة،مما يشجع على إمكانية استخدامه مستقبلاً كدواء بديل، أو مدعوماً مع المضاد الحيوي الموصوف لعلاج العديد من الأمراض البكتيرية .

الفصل السادس

التوصيات

6- التوصيات

Recommendation

- يجب استخدام مذيبات عالية القطبية لما لها من قدرة وكفاءة في استخلاص المركبات الفعالة.
- يجب رفع الوعي الصحي لدى المواطنين في تداول واستهلاك المضادات الحيوية، لتفادي استفحال مشكلة مقاومة الميكروبات لما تبقى من مضادات حيوية لازالت فعالة ضدها.
- يجب تكثيف البحوث حول النباتات الطبية المتواجدة في البيئة الليبية، وخاصة مع وجود التنوع النباتي والظروف المناخية الملائمة للنباتات، لإنتاج مركبات الأيض الثانوي الفعالة .
- الحث على إجراء دراسات متعمقة حول مستخلصات النباتات، التي أثبت أنها فعالة ومؤثرة من حيث فصل هذه المركبات، وتنقيتها،وتحديد تأثير كل مركب بدقة.
- الحث على إجراء تجارب تحديد السمية والجرعات المناسبة وتركيزاتها المؤثرة وذات الفعالية، التي تساعد على استخدامها كأدوية علاجية آمنة ذات منشأ طبيعي.
- يجب تكثيف التجارب المبدئية لهذه الدراسة حول إمكانية استخدام المستخلصات النباتية، لمضافات داعمة للمضادات الحيوية والتي أثبتت نجاحها ،وبناءً على ذلك يتطلب الأمر إجراء المزيد من البحوث حول الموضوع،لما له من فائدة علاجية واقتصادية، و للاستفادة من المضادات فاقدة الفعالية بدل من إهدارها.

الفصل السابع

المراجـــــــــع

7- المراجع
References

القرآن الكريم، الرعد، 4 .

أولا : المراجع العربية

- **الأمين، هالة أحمد (2012)** .شجرة المورينجا، إدارة الترويج والدراسات والإستثمار، وزارة التجارة السودانية.
- **جابو، خديجة والزاوية ذكار(2017)**. مساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة والفاعلية المضادة لتآكل الفولاذ X70 في وسط حمضي لمستخلصات نبات المورينجا *Moringa Oliefera (L.)*، رسالة ماجستير، كلية الرياضيات وعلوم المادة، قسم الكيمياء، جامعة قاصدي مرياح ورقلة/الجزائر.
- **الجنابي، جواد كاظم؛ كمال، صابرين عبد الأمير (2014)**. تقويم كفاءة مستخلصات الشاي الأخضر والدارسين في نمو الفطر *mentagrophytes* ، مجلة جامعة بابل، العلوم قسم علوم – الصرفة والتطبيقية، المجلد الثاني والعشرون، العدد الثاني، الصفحات 651-660 الحياة، كلية العلوم، جامعة بابل / العراق.
- **حمادي، عائشة وخراز سناء (2020)**. دراسة الفعالية البيولوجية لنبات المورينجا *Moringa oleifera Lam* النامي في منطقة وادي سوف، رسالة ماجستير، كلية علوم الطبيعة والحياة، قسم البيولوجيا، جامعة الشهيد حمه لخضر – الوادي.
- **الدوغجي، عصام حسين علي وعبد الرزاق حسن وحيدر (2015)** . الفعالية التثبيطية لمستخلصات الاوراق الجافة للمورينجا*Moringa oleifera Lam* في بعض أنواع البكتيريا الممرضة للإنسان، جزء من أطروحة دكتوراة، مجلة الكوفة للعلوم الزراعية، المجلد السابع، العدد الثاني، جمهورية العراق.

- **رمضان، مراد عبد الرازق (2015)** . النشاط المضاد البكتيري لمستخلص عصير الليمون على حيوية البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام، رسالة ماجستير، كلية العلوم، قسم علم النبات، جامعة بنغازي .
- **العباسي، حسن هادى حمود. (2016)**. تأثير تركيز مختلفة لمستخلصات مائية لبعض النباتات على عدة انواع من البكتيريا خارج الجسم، مجلة الكوفة للعلوم الزراعية العراق، مجلد 8، العدد4 ص 166-183.
- **فلاتة، نزيهة بنت سعيد عبد الرحيم (2013)** . دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية المحلية على النمو البكتيري، رسالة ماجستير، كلية العلوم التطبيقية، جامعة أم القرى، مكة المكرمة .

ثانيا : المراجع الأجنبية

- **Abalaka, M. E; S.Y. Daniyanl; S.B. Oyeleke and Adeyemo, S.O(2012)**. The antibacterial evaluation of *Moringa oleifera* leaf extracts on selected bacterial pathogens. *Journal of Microbiology Research*, 2(2): 1-4 .

- **Abbas ., K . K . and Elsharbasy ., F . S .(2019)**. Antibacterial Activity Of *Moringa oleifera* Against Pathogenic Bacteria In Sudan . *International Journal of Current Research .27-30* .

- **Abdulaziz Rabiu A., Dhiya D., Zawawi and Md. Sarwar J. (2015)**. DPPH antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of different part of drumstic tree *(Moringa oleifera Lam.)*. Faculty of bioresources and food Industry, University Sultan Zainul Abidin, Tembila Campus, Besut, Terengganu Malaysia *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(4):1423-1428.

- **Abdulkadir, I. S., Nasir, I. A., Sofowora, A., Yahaya, F., Ahmad, A. A., & Hassan, I. A. (2015).** Phytochemical screening and antimicrobial activities of ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam on isolates of some pathogens. *Journal of applied pharmacy*, *7*(4), 2-7.

- **Abdulkarim SM., K Long, OM Lai, SKS Muhammad and HM Ghazali, (2005).** Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. Food Chem., 93: 253-263.

- **Abubakar, I ., Usman, A., (2016**). Phytochemical and antibacterial investigations of (*Moringa oleifera*) leaf extract on selected pathogens, *Journal of Microbiology and Antimicrobials.* 8(5), PP. 28-33.

- **Adwan, G**. **and Mhanna, M.(2008)** .Synergistic Effects of plant Extracts and Antibiotics on *Staphylococcus* Strains Isolated from Clinical Specimens. *Middle- East Journal of Scientieic Research*.(3) : 134-139.

- **Alkasak, M. A. (2022) .**Astudy on the effect of two algal extracts on modulating the antibiotic activity to resist Methicillin – resistant *staphylococcus aureus* strains M.sc Thesis, Department of Botany, Faculty of science University. Of Tripoli.

- **Anonymous, (2013).** Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty – Third Informational Supplement ; publication M100-S23, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA2013.

- **Atakpama W., Kponor E.G., Kanda M., Dourma M., Nare M., Batawila M., Akpagana K. (2014).** *Moringa oleifera Lamarck (*Moringaceae) : une Ressource Phytogénétique à Usage Multiple. Revue CAMES. Vol. 02(1): 2-14p.

- **Atlas .R.M.; Brown, A. E and parks, L.C.(1995).** Exprimental Microbiology Laboratary Manual. Mc Graw Hill Companies Mos –by Company .St .Louis .

- **Balajee *et al*., (2004).** The ethanolicextracts of leaves of O. sanctum against Cryptococcus neoforms . (1):96-157.

- **Bansode, D. S .and Chavan , M . D.(2012).** Studies on antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit juices against selected enteric Pathogens. *International Research Journal of pharmacy* .11: 120-126.

- **Bauer, A. W ., Kirby, W . M., Sherris, J . C. and Turck, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol*.45(4): 493-496.

- **Besse F., (1996).** L'Arbre du mois – *Moringa oleifera* Lam. ; Le flamboyant – Bulletin de liaison des membres du réseau Arbres tropicaux No 40 ; 5p.

- **Bukar, A. Uba, A. & Oyeyi, T. (2010).** Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts against some food–borne microorganisms. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *3*(1).

- **Cai, L. (2014).** Tin Layer Chromatography. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. 6(3):1-6.

- **Chumark, P. Khunawat, P. Sanvarinda, Y. (2008).** The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera Lam* Leaves. *J Ethnopharmacol*, 116, 439-46.

- **Cowan, M. M.(1999)**. Plant products as antimicrobial agents.*Journal Microbiology*. 12:564-582.

- **Devendra, B. N., Srinivas, N., Prasad, V. S. S. L., & Latha, P. S. (2011).** Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam., leaf extract, against selected bacterial and fungal strains. International *Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(3), 13-18 .

- **Doughari, J. H., Pukuma, M. S., & De, N. (2017).** Antibacterial effects of Balanites aegyptiaca L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typh*i. *African Journal of biotechnology*, *6*(19).

- **Dubey, R . C and Maheshwari, D.K. (2002).** Practical Microbiology, S. Chand & Co. P. Ltd., Ram Nagar, New Delhi.

- **Eremwanarue, O. A., & Shittu, H. O. (2018).** Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* leaf extracts on multiple drug resistant bacterial isolates from urine samples in Benin City.*Nigerian Journal of Biotechnology*, *35*(2), 16-26.

- **Essawi, T. and Srour, M. (2000)**. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, *Journal. Ethnopharmacol* . 70 : 343 – 349.

- **Fahey, J.W.(2005).** *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. *Trees for Life Journal*. 1:5

- **Foidl, N . Makkar H.P.S. and Becker K, (2001).** The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses (45-76). In: Fuglie(editor). The miracletree: the multiple attributes of *Moringa*. -Wageningen: CTA; Dakar: CWS. -177p.

- **Gupta, R. Kannan GM, Sharma M, Flora SJS, (2018).** Therapeutic effects of *Moringa oleifera* of arsenic induced toxicity in rats, Environmental Toxicology and Pharmacology 20(3), 456-464.

- **Gurib – Fakim A . Medichal plants(2006) .**Traditions of yesterday and drugs tomorrow. Mol Aspects Med 2006;27: 1-93.

- **Ha lee, J . Hwan Eom, S. lee, E, Joong, Y, Jung kim, H, Rajo, M, Tae son, K, Jung lee, H, Kim. And mog kim, Y.(2014).** In vitro antibacterial and synergistic effect of phloro tannins isolated from edible brown sea weed Eisenia bicyclis against acne- related bacteria. *Algae Journal*.29 (1): 47-55.

- **Haroun, M.H. and Alkayali, S . R, (2016).** Synergistic effect of Thymbra spicata L .extracts with antibiotics against multidrug-resistant *staphylococcus aureus* and *klebsiella pneumonia* strains . *Iranian Journal of Basic Medical sciences*. 19:1193-1200.

- **Husnan, L. A., & Alkahtani, M. D. (2016).** Impact of *Moringa* aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi in vitro. Annals of Agricultural Sciences, *61*(2), 247-250.

- **Idris, A., & Abubakar., U. (2016**) **.**Phytochemical and antibacterial investigations of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract on selected bacterial pathogens, *Journal of Microbiology and Antimicrobials.* 8(5), PP. 28-33.

- **Iqbal, S. Bhanger, MI. (2006).** Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. J Food Compos Anal, 19, 544-55.

- **Jouda, M . Elbashiti, T. Masada, A. and Albayoumi, M .(2015).** The antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their synergstic effect with antibiotics. World *Journal of pharmacy and pharmaceuticals sciences.(2) 23-33* .

- **Karaman, I. Sahin, P. Gul-luce, M. Oguten, H. Son-gul M. and Adiguzed A. (2003):** Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnophar-macolology*, Vol.85 (2-3): Pp. 231-235.

- **Krishnamurthy, P.T., Vardarajalu, A. Wadhwani, A . Patel, V.(2015).** Identification and characterization of a potent anticancer fraction from the leaf extracts of *Moringa oleifera L*. Indian J. Exp. Biol. 53(2):98-103**.**

- **Kumar, V. Pandey, N. Mohan, N. & Singh, R. P. (2012)**. Antibacterial & antioxidant activity of different extract of *Moringa oleifera* Leaves–an in vitro study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *12*(1), 89-94.

- **Kwami, W. S., Saeed, H. A., & Hamad, M. N. M. (2020).** Screening the Antibacterial Activity of *Moringa oleifera* Leaves and Seeds Extract against Selected Members of Bacteria.

- **Mayakrishnan, P. Seung-Hyun, K . Asokan, S. Murugesan, Gh. Ill-Min Ch., (2018).** polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera* .food bioscience 26, 23_29.

- **Mbikay, M., (2012).** The rapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronichyperglycemia and dyslipidemia: a review, Front. Pharmacol 3:1–12

- **Michoi, S. Jang, E. and Cha, J. (2015).** Synergistic Effect between Fucoidan and Antibiotics against clinic Methcillin –Resistant *Stabhylococcus aureus* . Advances in Bioscience and Biotechnology, (6) :275-285 **.**

- **Morton JF., (1991).** The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae), a boon toarid lands. Econ. Bot; 45: 318-333.

- **Nafis, A . Elkhalloufi, F. Aknaf, A. Oudra, B. Marraik, N. Rashed, S. Elgorban, A. Syed, A. Hassani, A., and Custodio, L. (2021).** In vitro antimicrobial and Synergistic effect of essential oil from the red macroalgae centroceras clavulantum(C. Agardh)

Montagne with conventional antibiotics. *Asia Pacific Journal of Tropical Biome – dicine, 11 (9) :414-420.*

- **Oladeji, OA. Taiwo, KA. Gbadamosi, SO. Oladeji BS. and Ishola MM. (2017).** Studies on Chemical Constituents and Nutrient Bioavailability in *Moringa oleifera* Leaf and Seed. *Journal of Scientific Research and Reports,* 14(1):1-12.

- **Oluduro, A. O. (2012)**: Evaluation of antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. leaf in South-Western Nigeria. *Malaysian Journal of Microbiology*, *8*(2), 59-67.

- **Olson ME, (1999).** The home page of the plant family Moringaceae, Available at: www.mobot.org/gradstudents/oslon/Moringahome.html.

- **Paliwal, R. V., Sharma, Pracheta and Sharma, S. (2011).** Elucidation of free radical scavenging and antioxidant activity of aqueous and hydro-ethanolic extracts of *Moringa oleifera* pods. *Res.J.Pharm .Tech*., 4: 566-571.

- **Parrotta J. A. P. Dr . (2009).** *Moringa oleifera* LAM., 1785 ; Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch and Atlas der Dendrologie ; Roloff A., Weisgerber H., Lang U., Stimm B. ; WILEY-VCH Verlag Gmbh H & Co. KGaA, Weinheim ; 8p.

- **Pinal, P.Nivedita, P.Dhara, P .Sharav, D. Dhananjay, M. (2014).** Photochemeical analysis and antifungal activity of *Moringa oleifera*, international *journal of pharmacy and pharmaceutical science* .6(5)

- **Price, D. M. (1985)** .The *Moringa* Tree. The *Moringa* tree by Dr. Martin L. Price Published 1985 ; Revised 2000, 2002, 2007 by ECHO Staff.

- **Quattrocchi and Umberto, (2000).** CRC World Dictionary of Plants Names: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms and Etymology., 3.CRC Press. P. 1731.

- **Roloff, A. Weisgerber, H . Lang, U. Stimm, B . (2009) .** *Moringa oleifera lam* enzyklopädie der holzgewächse, handbuchund atlas der dendrology. ;40:p.1-6.

- **Seleshe, S. & Kang, S. N. (2019):** In vitro antimicrobial activity of different solvent extracts from *Moringa* stenopetala leaves. Preventive nutrition and food science, *24*(1), 70 .

- **Shih, MC. CM. Chang, SM. Kang and ML Tsai . (2011).** Effect of Different Parts (Leaf, Stem and Stalk) and Seasons (Summer and Winter) on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera*. Int. J. Mol. Sci., 12:6077-6088.

- **Smith, B . E, (2016).** Anti- bacterial brorties of ethanolic *Moringa oleifera* leaf extract and proteomic analysis of Its effects on *Escherichia coli,* Submitted to the graduate school at Appalachia University in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of since Department of Biology.

- **Theophile M., (2014).** Effet de la fertilisation sur la croissance et la production De *Moringa oleifera* local et *Moringa oleifera* PKM-l dans la Région des Cascades (Burkina Faso). Mémoire master : Production végétales. Bobo-Dioulasso: UPDB. 68p.

- **Uwaezuoke, J. C. and Aririatu, L. E. (2004).** A survey of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains from clinical sources on *Owerri. Journal Applied Sciences Environ* . 8: 67 – 69 .

- **Vinodini, N . A., Pratik, K. C., Anwar, A., Suman, V . B. and Sheila, R. P .(2014**). Evaluation of liver functions with *Moringa oleifera* leaf extract in cadmium induced adult wistar albino rats. *International. Journal.Plant and Environ.* Sci .vol. 4 no. 3: 103-106.

- **Vlahov, G. PK Chepkwony, and PK Ndalut. (2002). NMR** characterization of triacylglycerols of *Moringa oleifera* seed oil: an "oleic-vaccenic acid" oil. *Journal*. *Agric. Food Chem*; 50: 970-975.

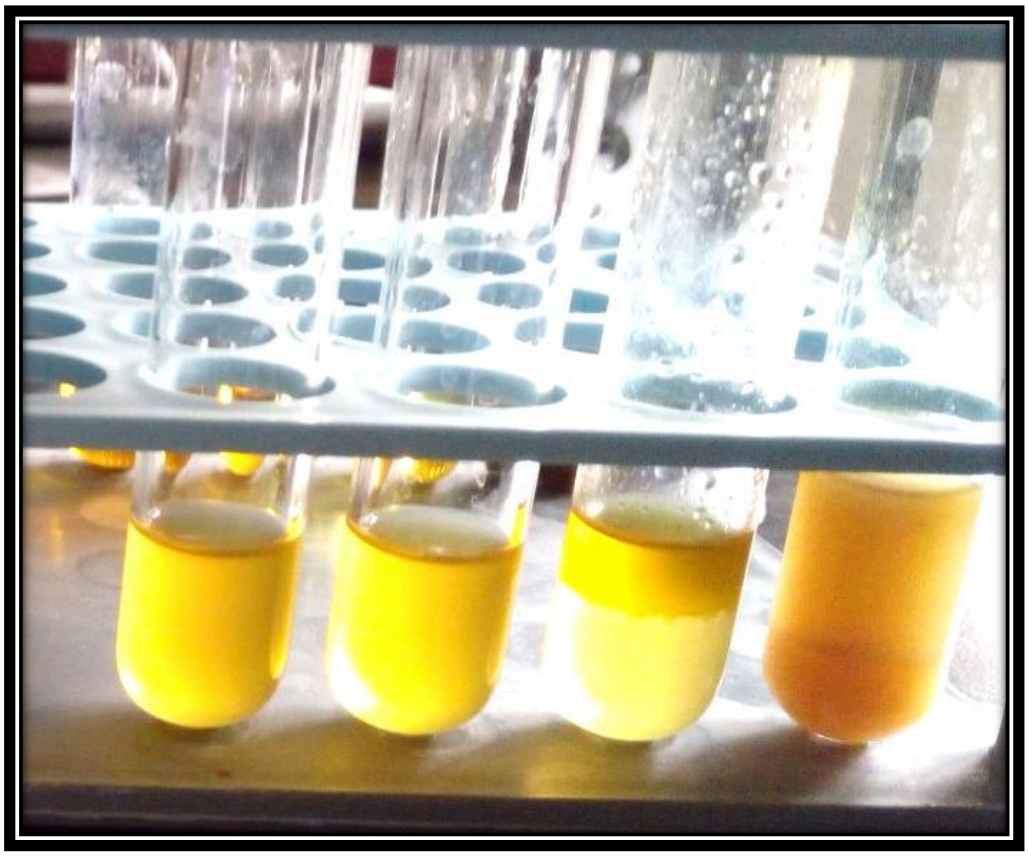
- **Vongsak, P . Sithisarn, S . Mangmool, S . Thangpraditchote, Y . Wongkrajang, W. Gritsanapan (2013) .**Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method Ind. Crops Prod., 44, pp.566-571.

- **Working Party the British Society for Antimicrobial Chemotherapy.(1991**). Aguide to antibiotic sensitivity testing .*Journal Antimicrobial Chemothe*, 27 (Suppl.D):1-50

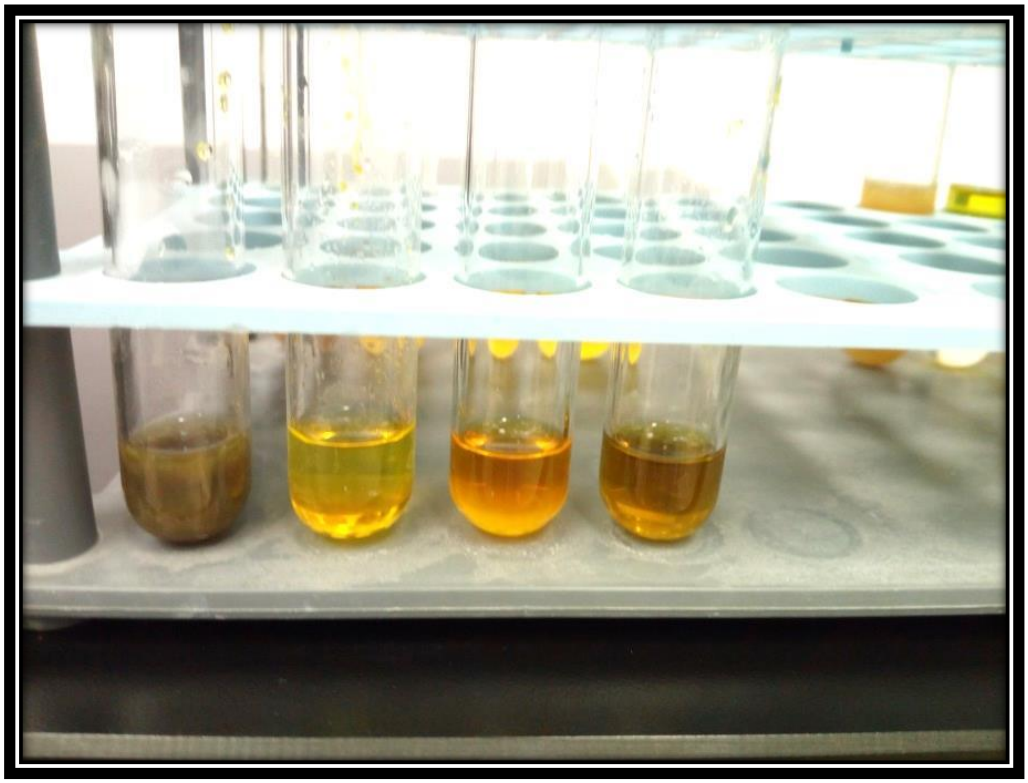
- **Ydjedd, S. Chaalal, M. Richard, G. Kati D.E. López-Nicolás R., Fauconnier, M. L &Louaileche H. (2017)**. Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian *Ceratonia siliqua* L. pods during ripening stages. *International Food Research Journal*. 24 (5): 2041-2049.

الفصل الثامن

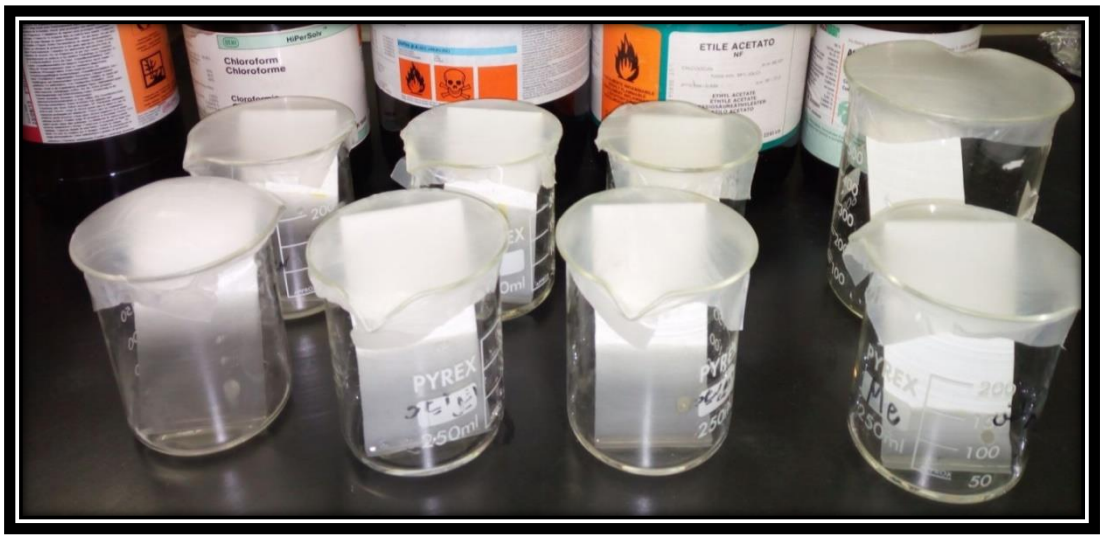
الملاحـــــــــــق



شكل (10) الكشف المبدئي عن الفلافونيدات Flavonids

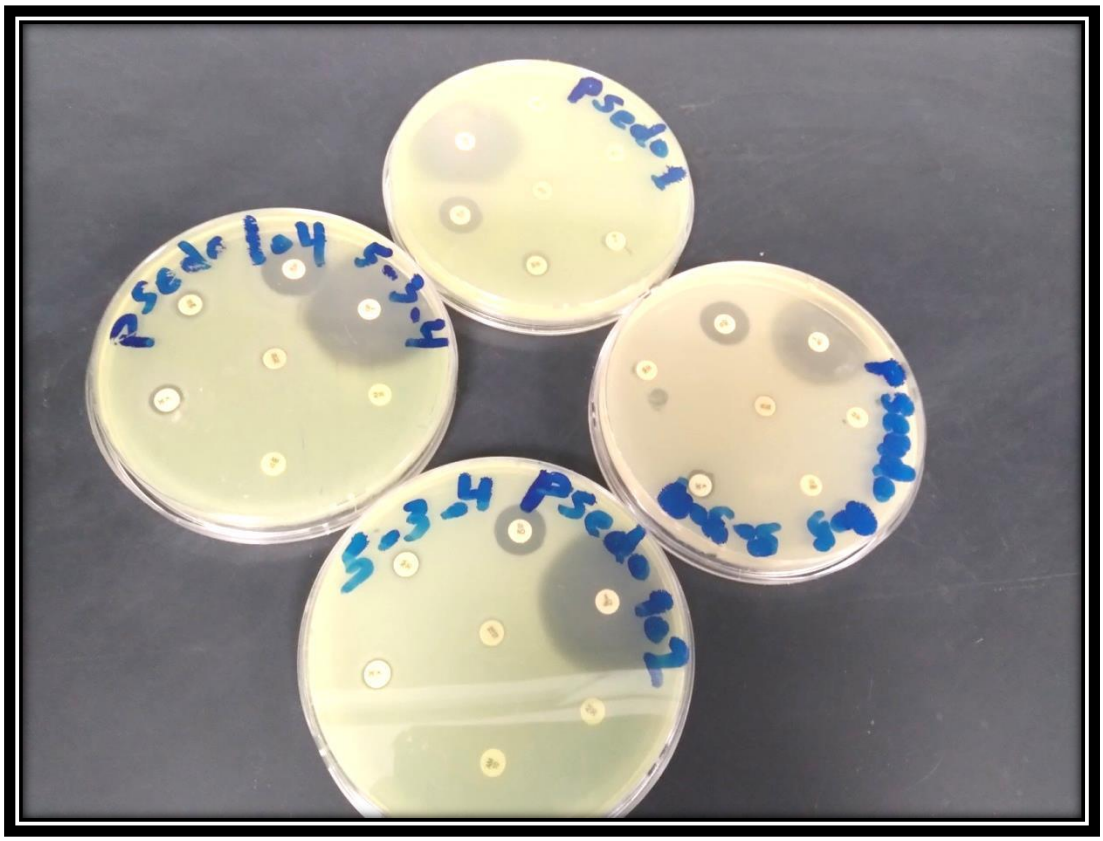


شكل (11) الكشف المبدئي عن القلويدات Alkaloids

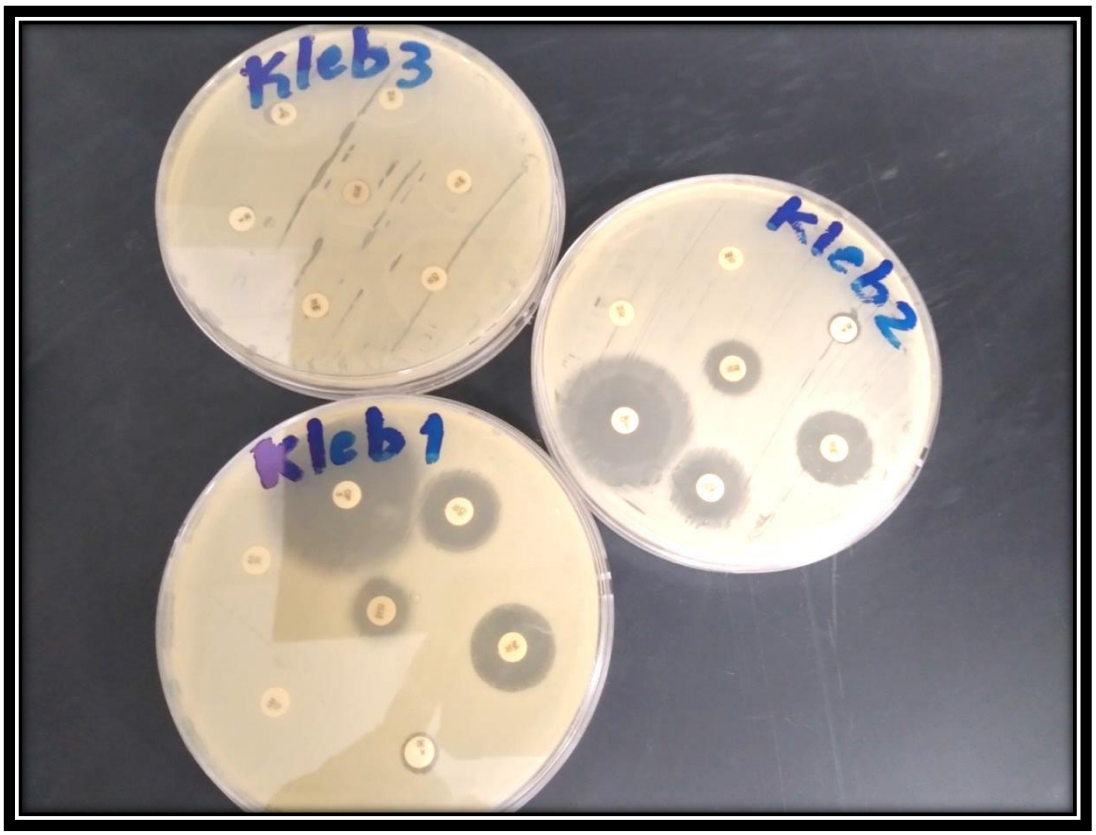


شكل (12) : يوضح الفصل الكروماتوغرافي بواسطة كروماتوكراف الطبقة الرقيقة وعدد النقاط الممثلة للمكونات المفصولة

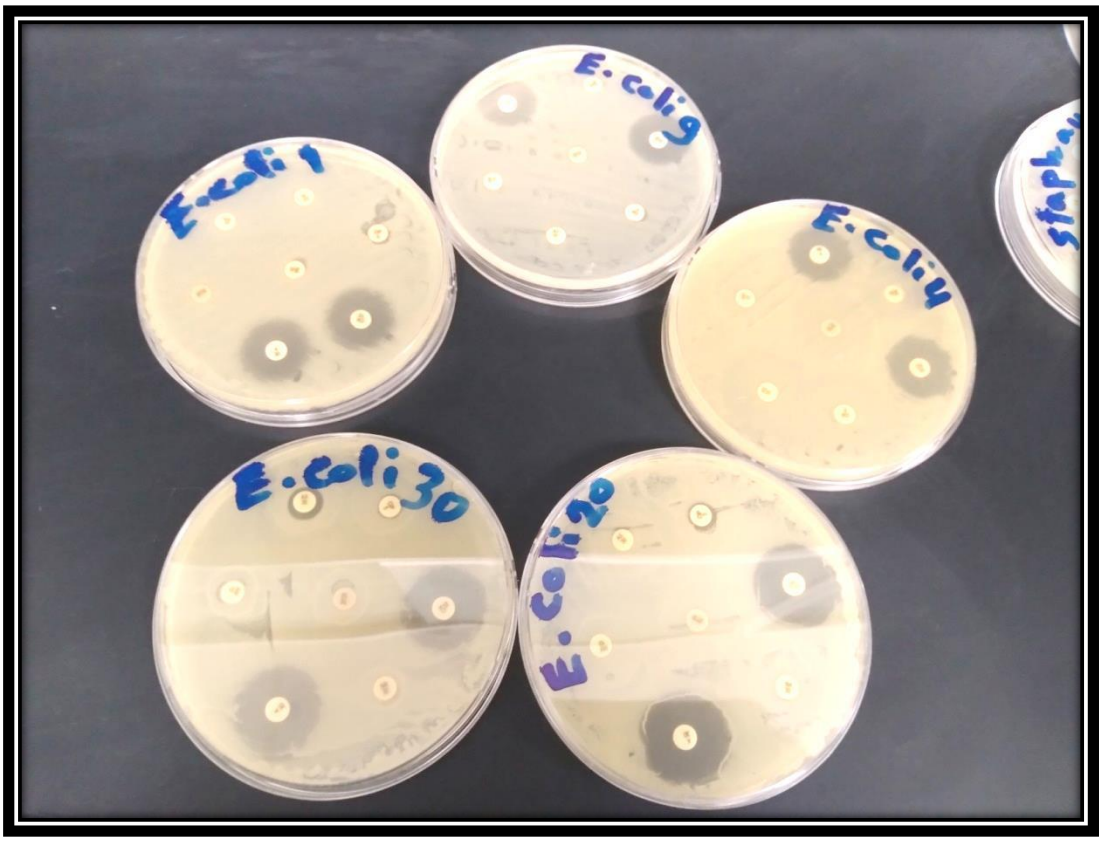
شكل (13) يوضح المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة



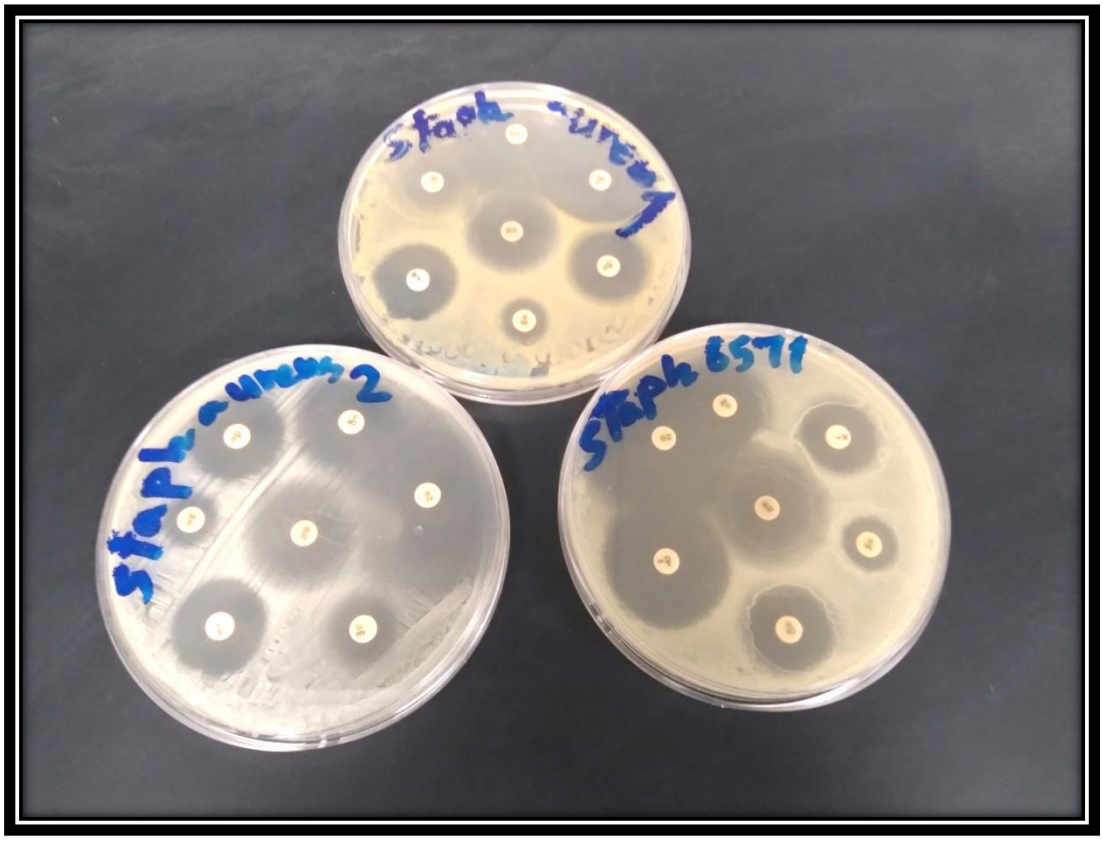
شكل (14) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Pseudomonas*



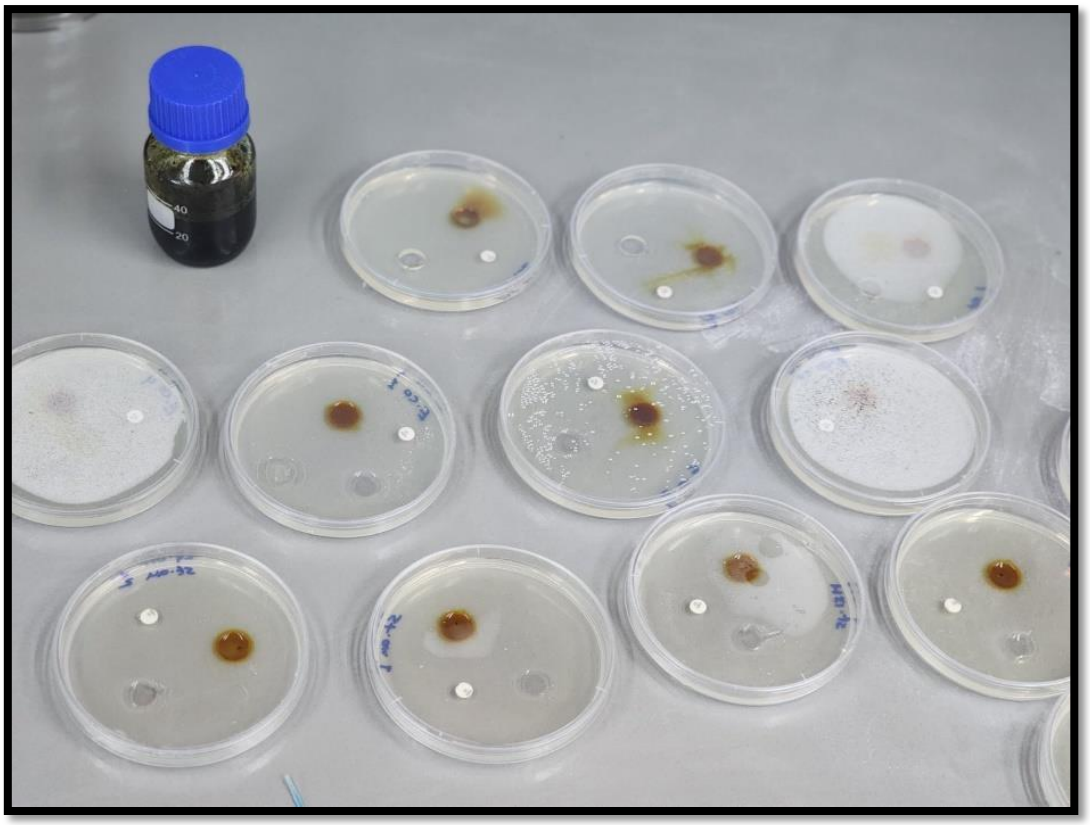
شكل (15) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Klebsiella*



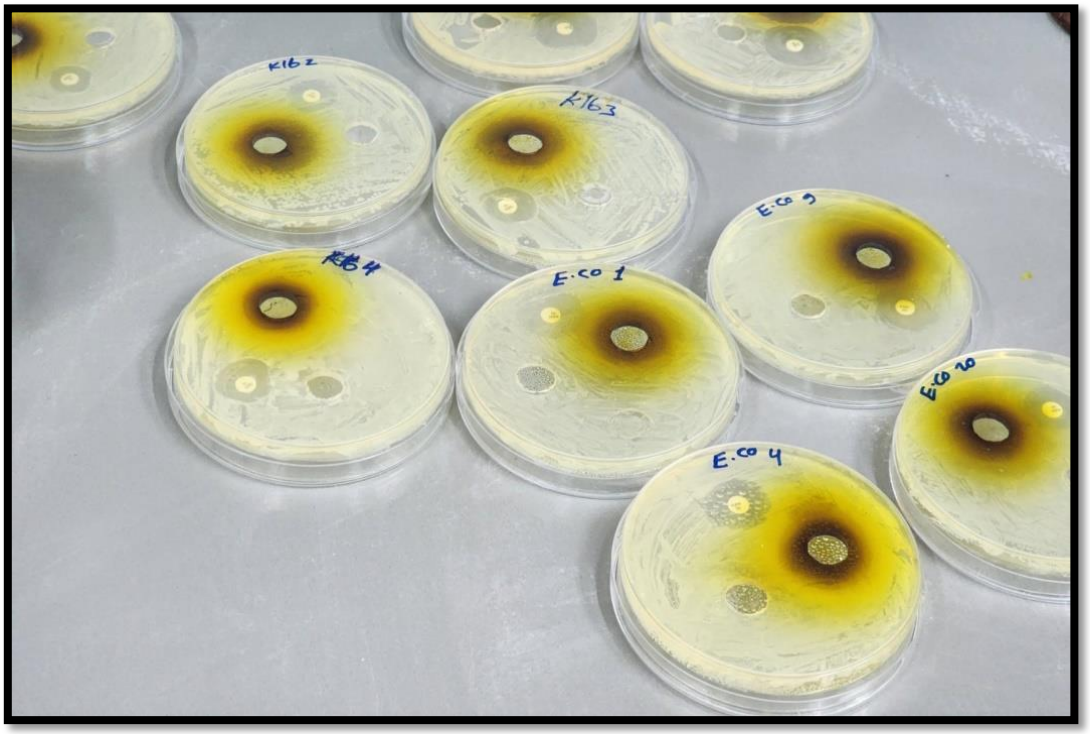
شكل (16) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Escherichia. Coli*



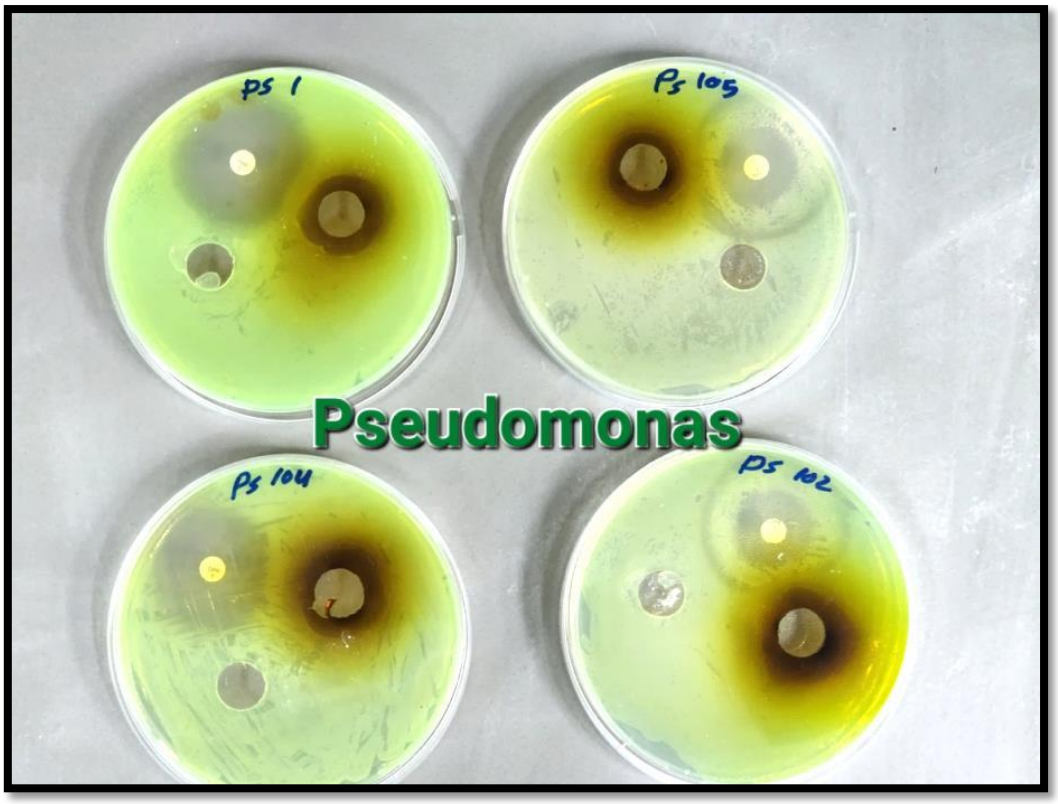
شكل (17) اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لسلالات بكتيريا *Staphylococcus*

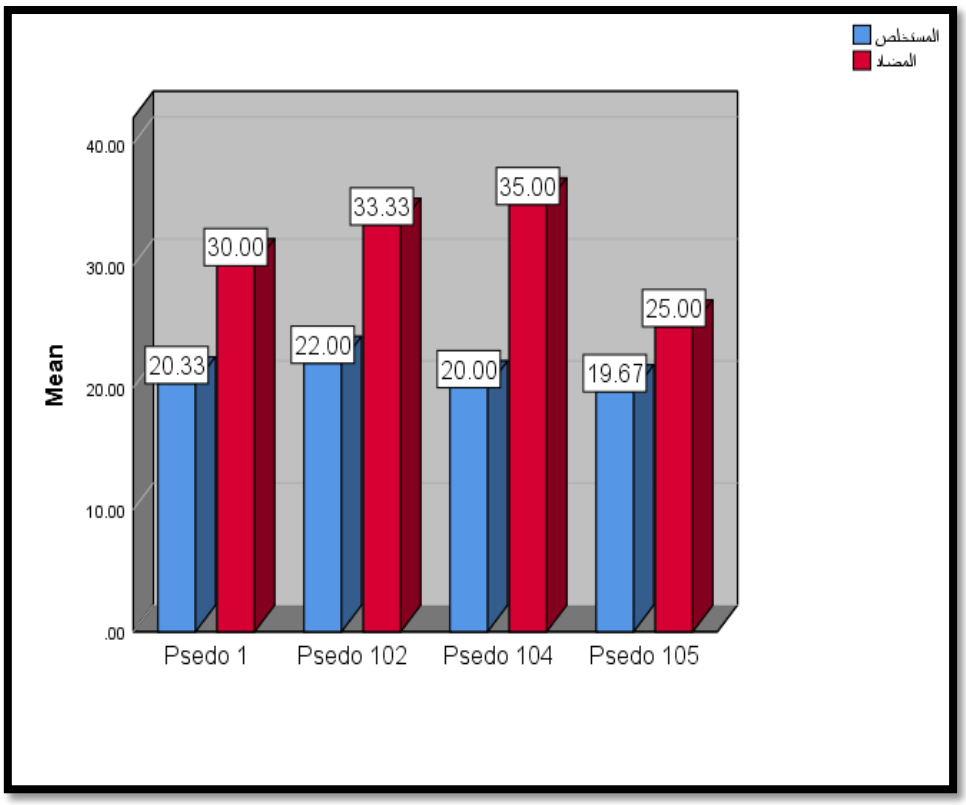


شكل (18) : تجهيز الأطباق لاختبار التأثير المضاد للبكتيريا بطريقة الانتشار في الحفر قبل وضعها في الحاضنة

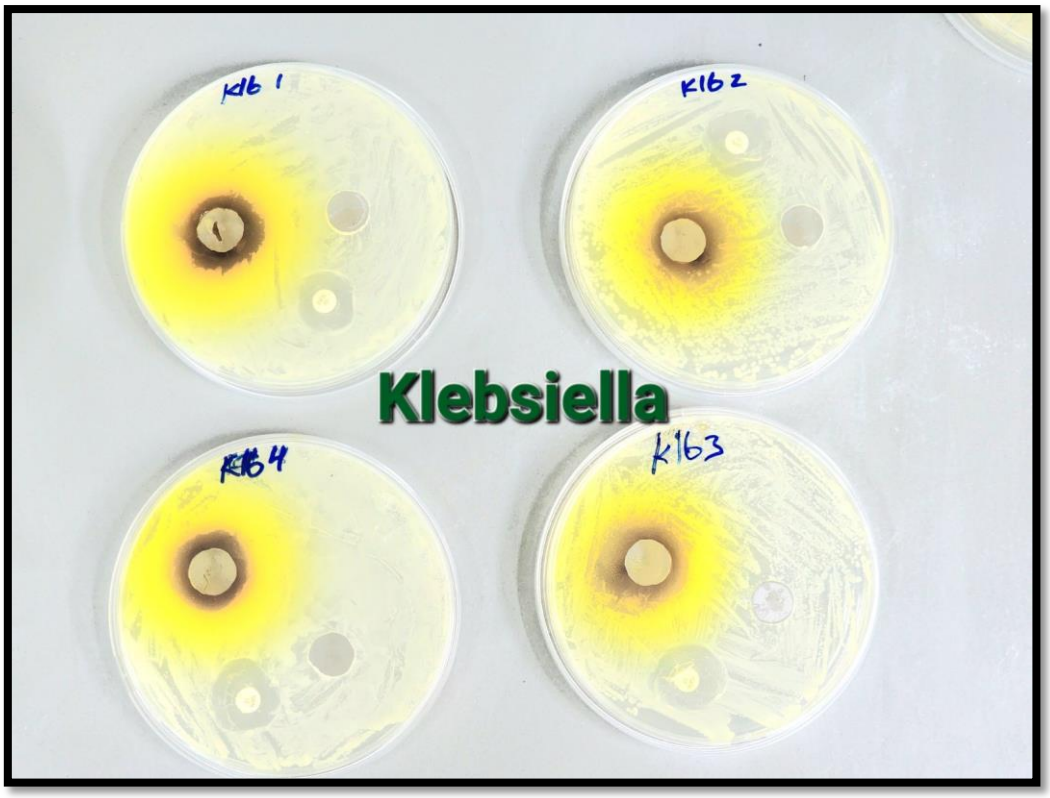


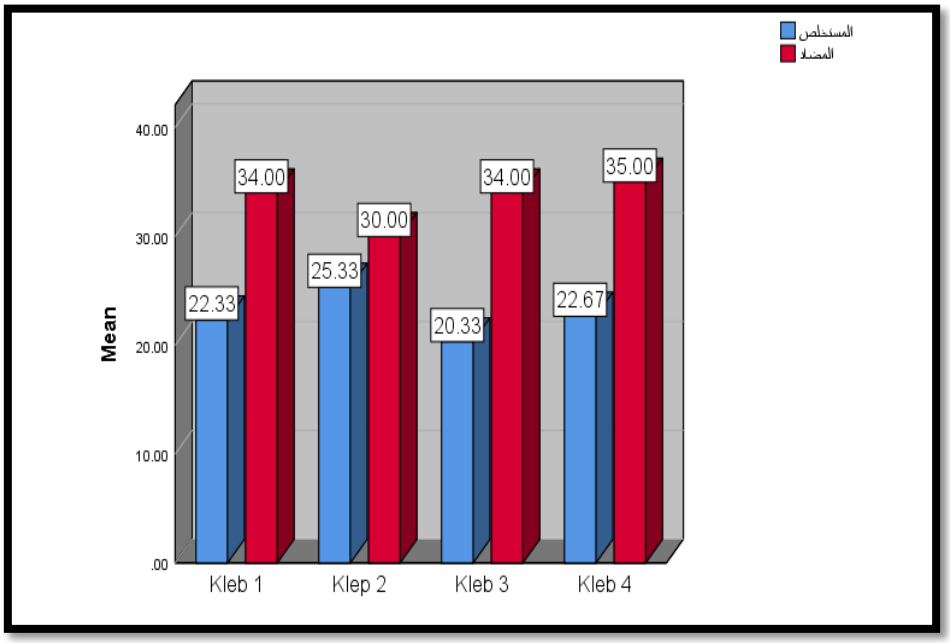
شكل (19) : يوضح اختبار التأثير المضاد لمستخلصات أوراق المورينجا ضد البكتيريا



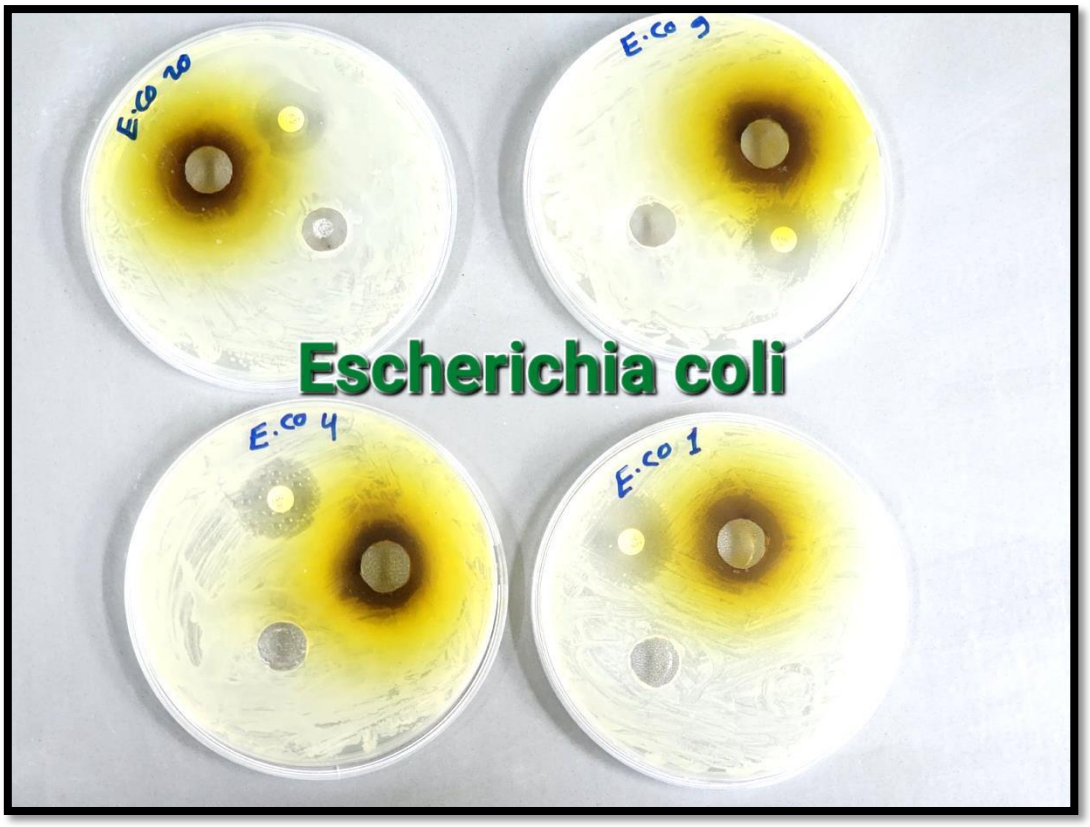


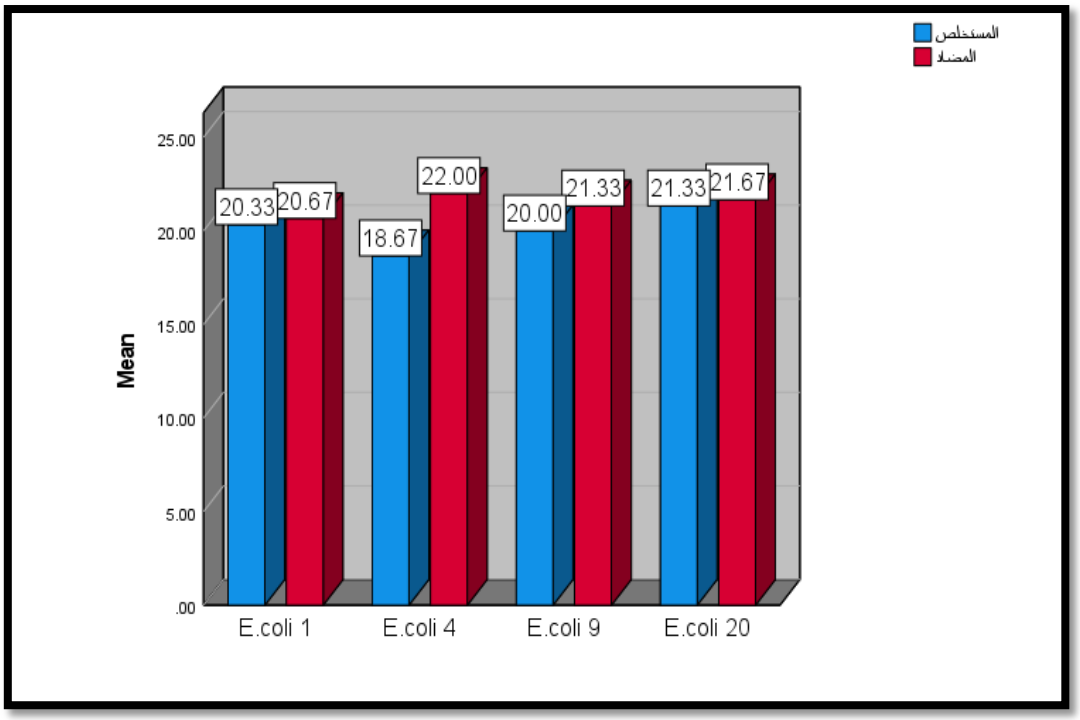
شكل (20) متوسطات أقطار مناطق التثبيط لمستخلص أوراق المورينجا والمضاد الحيوي Ciprofloxacin لسلالات بكتيريا *Pseudomonas*



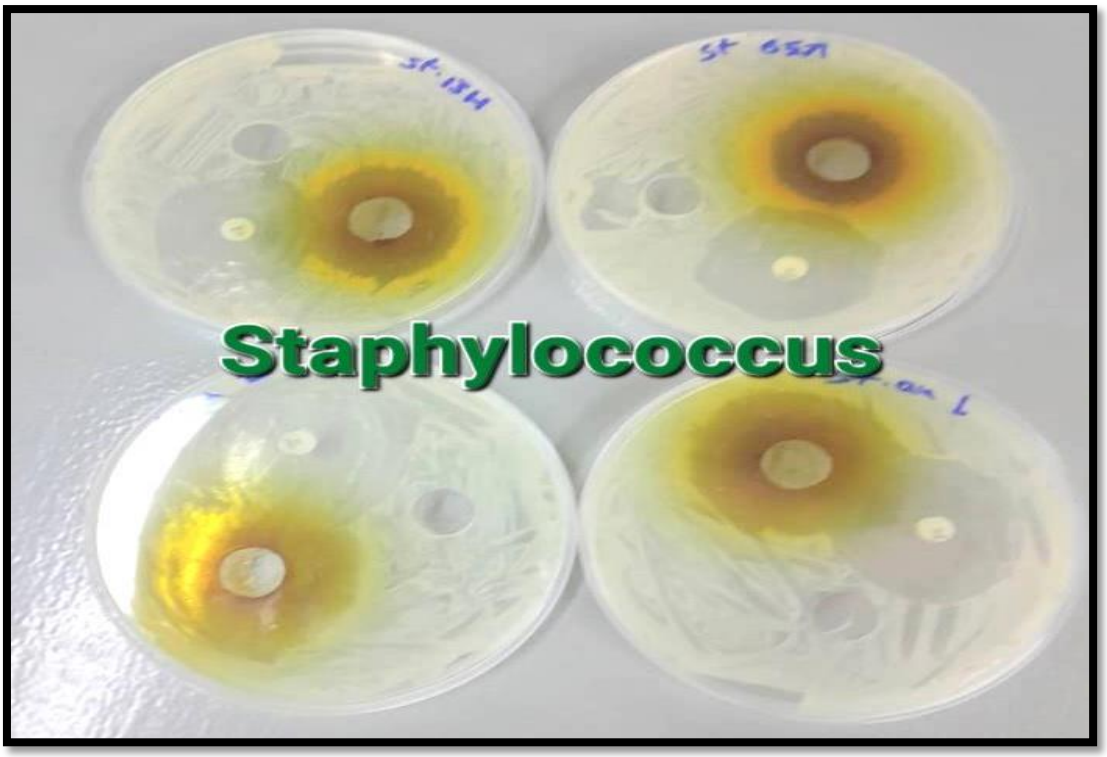


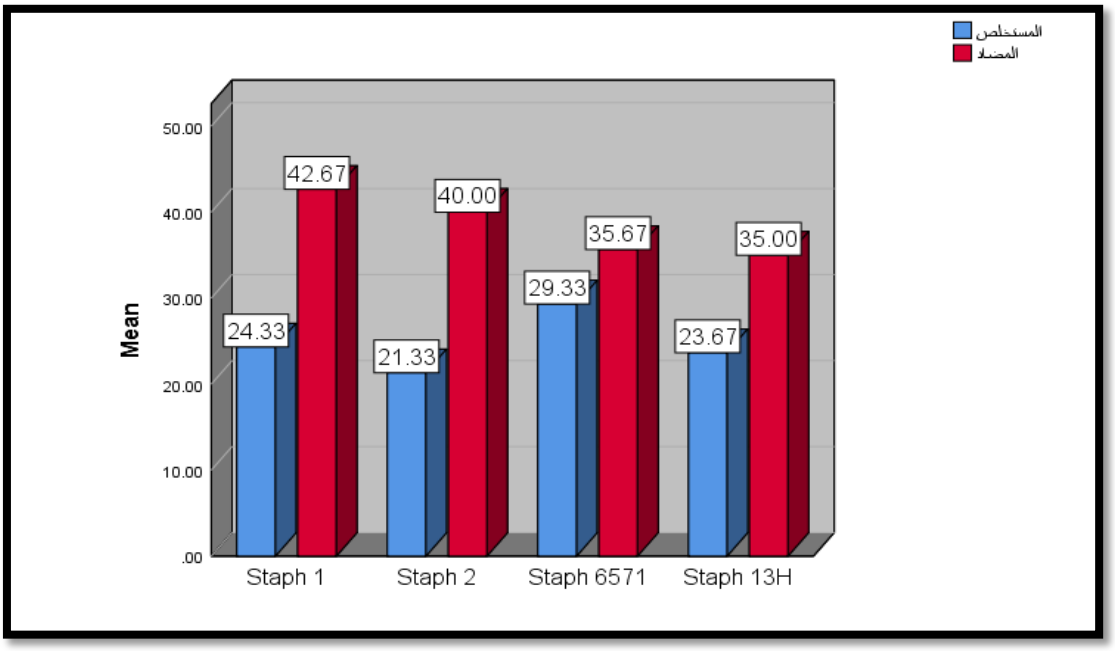
شكل (21) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Gentamicin لسلالات بكتيريا *Klebsiella*



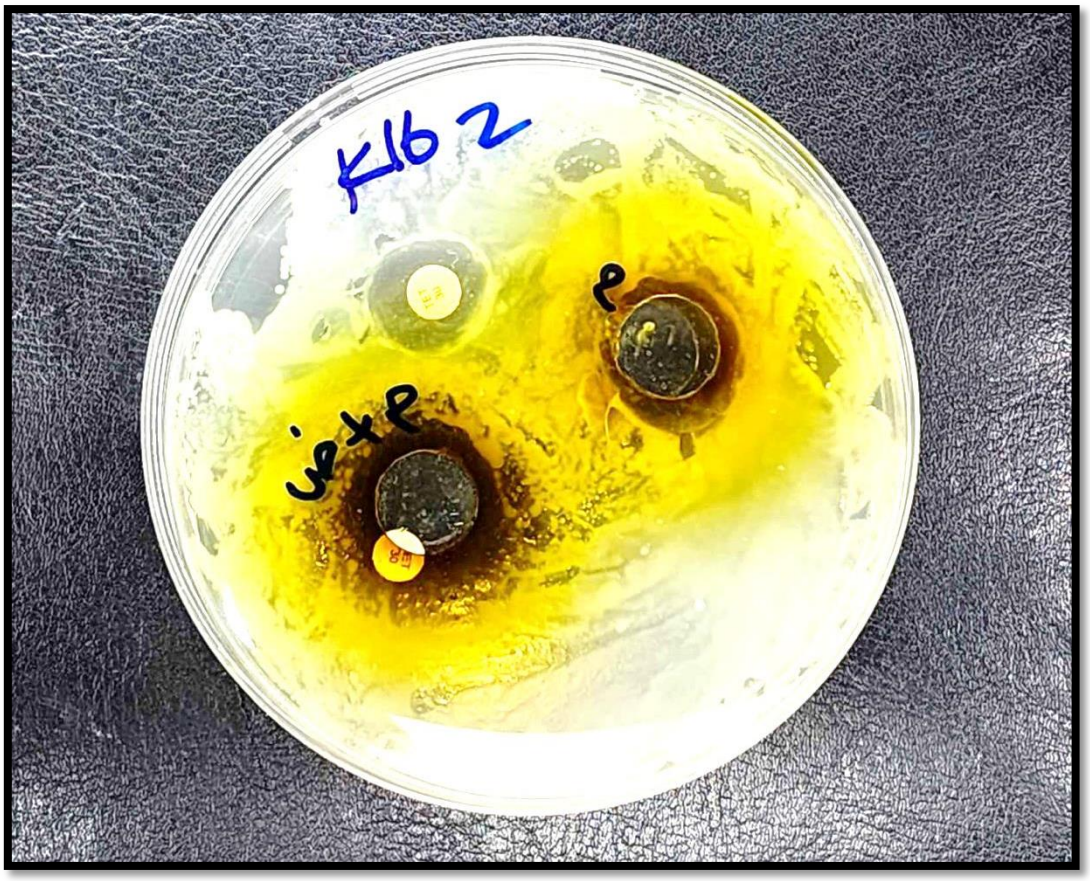


شكل (22) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Kanamycin لسلالات بكتيريا *Escherichia. coli*

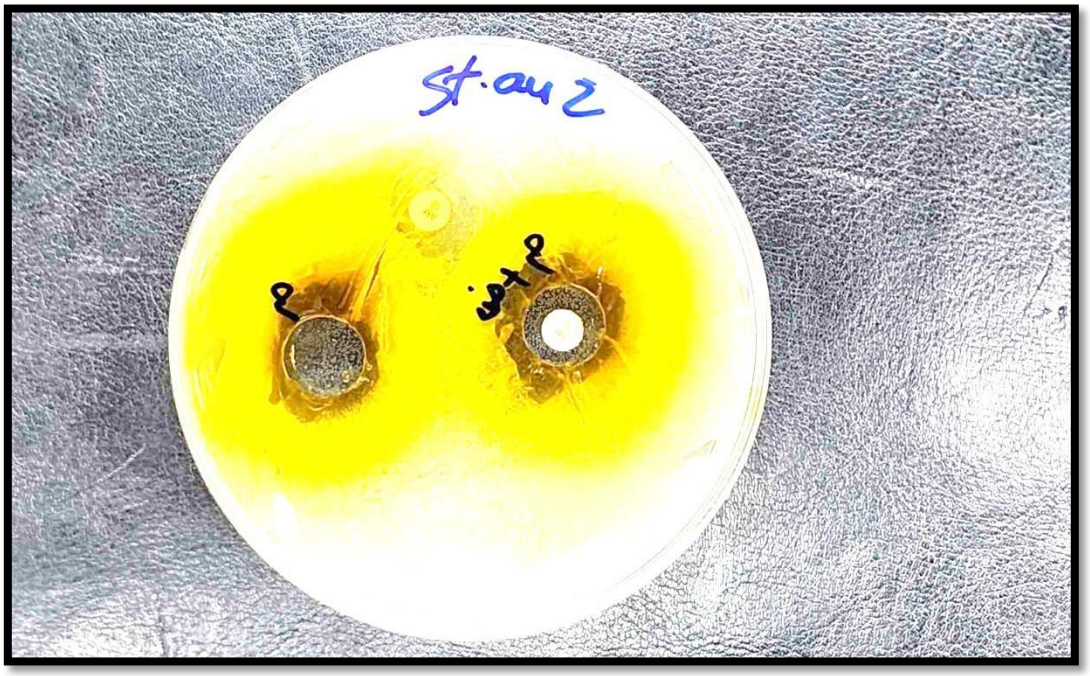




شكل (23) متوسطات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا والمضاد الحيوي Amoxicillinلسلالات بكتيرياStaphylococcus



شكل (24) متوسطات أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد(Tetracycline (TE10، والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية *Klebsiella spp.2*



شكل (25) أقطار مناطق التثبيط لكل من المستخلص، المضاد Ampicillin (AM10)، والمستخلص والمضاد معا للسلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus2*