1.1 المقدمة INTRODUCTION:

تسوس الأسنان *Dental Caries* يعتبر واحد من الأمراض الأكثر شيوعا ومكلفة في العالم، حيث أنه يمثل مشكلة كبيرة لمقدمي الخدمات الصحية ، لتقليل انتشار تسوس الأسنان يجب معرفة طبيعة و دور الكائنات الحية الدقيقة في أمراض الأسنان . سطح السن مغطي بطبقة من الأغشية مثل طبقة *Slime layer* تتكون من مجموعة من الخلايا البكتيرية والبوليمرات اللعابية والحطام الغذائي، حيث يوفر الغشاء الحيوي بيئة ملائمة لنمو العديد من أنواع البكتيريا حيث يتكون التسوس من سبعة أنواع من البكتيريا و منها *Streptococcus mutans* , *Streptococcus sobrinus* ، حيث تسمي بالمكورات العقدية ، توجد *Streptococcus mutans* في الفم و البلعوم و الأمعاء ، وتعمل على التصاق بسطح المينا وإنتاج الأيض الحمضي و أيضا لها القدرة على بناء احتياط الجليكوجين والقدرة على تصنيع السكريات خارج الخلية الموجودة في تسوس الأسنان. حيث أنها منتج قوي للأحماض وبالتالي تسبب الإصابة بتسوس الأسنان (Forssten *et al* .,2010).

و يعتبر علم التقنيات الحيوية من العلوم الحديثة التي تطورت سريعا و هو ذو أهمية كبيرة لحياة الإنسان ورفاهيته، و تكمن أهمية هذا البحث في استخدام مستخلصات أوراق نبات *Moringa oleifera* في تثبيط أو قتل البكتيريا المسببة للتسوس *Streptococcus mutans*، وهذا البحث شأنه شأن البحوث والدراسات السابقة التي تدعو إلي استخدام الموارد النباتية كمضادات طبيعية حيوية بديلا عن المضادات الحيوية المصنعة المستخدمة حاليا التي أدت إلي ظهور أعداد كبيرة من البكتيريا المقاومة لها .

تعتبر النباتات الطبية مصدرا للعديد من المواد الفعالة التي تستعمل في مداواة مختلف الأمراض. لقد عرفت البشرية منذ القدم الكثير عن تلك النباتات في الحضارات القديمة مثل الحضارة في بلاد مصر والهند والصين، ولا زال الكثير من الشعوب يستعملها إلى الآن كما استعملت منذ آلاف السنين

(غميض و الوحش.، 2019)

يعد نبات *Moringa oleifera* المعروف باسم شجرة أفخاذ أو شجرة الفجل، وتستخدم الأوراق كمكمل غذائي لأن لها مذاق ونكهات مميزة ، حيث يمكن تخزين الأوراق لعدة أشهر دون فقدان العناصر الغذائية الوظيفية (Jwa., 2019).

تستخدم *Moringa oleifera* كمصدر طبي حيث تستخدم لعلاج العديد من الأمراض وتوجد في العديد من المناطق المدارية ، شبه مدارية، وتوجد أيضا في الهند، أفريقيا، أمريكيا الجنوبية والوسطي، المكسيك وفي جميع أنحاء آسيا وجنوب شرق آسيا. تحتوي هذه الشجرة علي مضادات الأكسدة في الغذاء ولديها أيضا مجموعة من الاستخدامات الطبية والقيمة الغذائية العالية ، وتعتبر أوراق هذا النبات مصدرا غنيا للكاروتينات والفيتامينات والمعادن والأحماض الأمينية والقلويدات والفلافينويدات ومجموعة نادرة من المركبات الفينولية، بما في ذلك الزيتين والكريسيتين والكامبيفرول والأبيجينين والعديد من المكونات النباتية المهمة التي توفر الوقاية من الأمراض (Ali *et al*., 2015) ، و كذلك الكربوهيدرات و الجليكوسيدات و الكومارينات و التانينات و الصابونيات (غميض و الوحش.، 2019)

تحتوي أوراق *Moringa oleifera* على بيتا كاروتين، وفيتامينE، ويمكن استخدامها كمضادة للأكسدة، قد تكون الأدوية التقليدية مثل نبات *Moringa oleifera* علاج فعال حيث تكون أرخص وأقل سمية من الأدوية التجارية (Jwa., 2019)، لذلك فإن أوراق *Moringa oleifera* يمكن استخدامها كدواء، حيث تحتوي الاوراق على نسبة عالية من فيتامين B

. (Patel, & Mohan., 2018)

تستخدم أوراق *Moringa oleifera* في الأغلب للأمراض الطبية وكذلك لتغذية البشر، لأنها غنية بالمواد المضادة للأكسدة والمواد المغذية الأخرى، حيث تستخدم أوراق *Moringa oleifera* لعلاج الأمراض المختلفة مثل الملاريا وحمي التيفود وارتفاع ضغط الدم و السكري. والأوراق الطازجة ل *Moringa oleifera* هي مصدر لفيتامين A وتحتوي أيضا على 200مجم/ 100غرام من فيتامين C وهو تركيز أكثر من الموجود في البرتقال، تحمي أيضا أوراق *Moringa oleifiera* الجسم من الجذور الحرة والسموم والملوثات (Jimenez *et al*., 2017) .

التصنيف العلمي لشجرة *Moringa oleifera* :

Kingdom : Plantae

Order: Brassicales

Family: Moringaceae

Genus: Moringa

Species: M. oleifera

.(Raja *et al*., 2016)

ترتبط *Streptococcus mutans* بشكل خاص بتسوس الأسنان بسبب الأيض السريع وتحملها القوي للحمض، تقوم *S.mutans* بتخليق الجلوكان من السكروز، حيث يساهم الجلوكان في تكوين الغشاء الحيوي ويرتبط ببروتينات الغشاء الحيوي ويعمل على حماية البكتيريا في الغشاء الحيوي من العوامل المضادة للميكروبات (Jwa.,2019) .

يتكون *Oral Micro flora* من انواع عديدة من البكتيريا من ضمنها *Streptococcus mutans* و هي تمتلك العدد الأكبر فيما بينها .أما مرض التسوس فينتج بسبب تزايد وتراكم هذه الأعداد من البكتيريا و مركبات *Poly schacaride* التي تصنع بواسطة أنزيم *Glycosyltransferase* الذي تنتجه *Streptococcus mutans* (منظمة الصحة العالمية.،2008) .

حيث أن *Streptococcus mutans* موجبة لجرام، غير متحركة، غير بوغية، سالبة الكتالاز، بكتيريا لا هوائية اختيارية ، موجودة في تجويف الفم البشري (El-Shebiny., 2014) .

التصنيف العلمي للبكتيريا:

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Lactobacillales

Family: Streptococcaceae

Genus: Streptococcus

Species: S.mutans

(El-Shebiny., 2014)

من مخاطر *Streptococcus mutans* أنها تنتقل إلي الدم وتسبب إلتهاب الشغاف المعدي، حيث أنها تغزو مجري الدم بعد علاج الأسنان وكذلك عبر العناية اليومية للفم، كما أنها لها خطورة الإصابة بمرض Infection Endocarditis (IE) في الأشخاص الذين يعانون من أمراض القلب

. (Otsugu *et al*.,2017)

تختلف المضادات الحيوية في فاعليتها ضد البكتيريا فهناك مضادات قاتلة حيث لها القدرة على قتل البكتيريا مثل Ampicillin و المضادات آخرى تعمل على تثبيط نمو البكتيريا من خلال ايقاف تكاثر البكتيريا مثل Chloramphenicol و Tetracyclin ، و آخرى تعمل على إيقاف تكوين الجدار الخلوي للبكتيريا كمضاد الحيوي Vancomycin و Tetracyclin مما يؤدي إلي موت البكتيريا ، و أيضا توجد مضادات لديها القدرة على ايقاف تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية مثل Erythromycin .

و على الرغم من تنوع و انتشار المضادات الحيوية إلا أن الاستخدام المتكرر و الغير منتظم لهذه المضادات في علاج أمراض الفم أدى إلي ظهور سلالات مقاومة لبعض أنواع المضادات الحيوية المستخدمة في علاج أمراض الفم و خصوصاً التسوس .

و يستخدم أطباء الأسنان المضاد الحيوي Tetracyclin بشكل موسع في القضاء على البكتيريا المسببة لأمراض التسوس لأنه يؤثر على معظم الجراثيم الفموية ، في حين يقل استخدام المضاد الحيوي Erythromycin و ذلك لأنه لا يؤثر بدرجة كبيرة على الجراثيم اللاهوائية الاجبارية ، وأيضا يسبب آثار جانبية على المرضى كالغثيان والاسهال (Glazer & Nikaido., 2007) .

2.1 أهذاف البحث :

يعتبر تسوس الأسنان من الامراض الأكثر شيوعا بمختلف الأعمار، وهناك الكثير من الدراسات لعلاجه بالنباتات الطبيعية ولذلك تهدف هذه الدراسة إلى :

1_عزل وتعريف البكتيريا المعزولة من المرضى المصابين بتسوس الأسنان .

2_دراسة تأثير بعض المضادات الحيوية على بكتيريا المسببة للتسوس .

3_دراسة تأثير المستخلص الكحولي والمائي لأوراق نبات المورينجا أوليفيرا على البكتيريا .

4_دراسة التأثير التآزري لمستخلص أوراق نبات المورينجا أوليفيرا مع بعض المضادات الحيوية في منطقة الدراسة.

1.2 الدراسات سابقة :

في عام 1924 عزل Clarke وهو أول من اكتشف هذه البكتيريا كائنا حيا من الآفات الحادة ووصفه بأنه *S.mutans*، لأنه اعتقد أن الخلايا ذات الشكل البيضاوي المرصودة كانت أشكالا متحولة من العقديات. ومع ذلك لم تحظ *S.muntas* باهتمام أكبر من الأوساط العلمية إلا في أواخر الخمسينات، وبحلول منتصف الستينيات من القرن العشرين، تم الاعتراف به باعتباره عاملا رئيسيا في المسببات المرضية في تسوس الأسنان (Lemos.,2013) .

في العقدين التاليين بدأ الباحثون في الكشف عن الفيزيولوجيا المرضية ل*S.mutans* ، و خلال هذه الفترة طورت الطفرات في المختبر أو في الجسم الحي على حد سواء ، و نتيجة لجهود هؤلاء الباحثين الرواد تم تحديد الصفات الرئيسية ل*S.mutans* وهي القدرة على إنتاج كميات كبيرة من الأحماض العضوية من الكربوهيدرات المستقلبة و القدرة على البقاء على قيد الحياة عند انخفاض درجة الحموضة، القدرة على توليف متجانسات جلوكان من السكروز، والتي تلعب دورا حاسما في التعلق الأولي والإستعمار وتراكم الأغشية الحيوية على أسطح الأسنان، مع التقدم في التقنيات الوراثية الجزيئية في الثمانينيات والتسعينيات بدأ العلماء يدركون بسرعة أكبر كيف مكنت مسارات الأيض *S.muntas* من التطور لتصبح ممرضة متخصصة في طب الأسنان(Lemos.,2013) .

أخيرا مع إطلاق أول جينوم *S.mutans* كامل في عام 2002، استفاد المجتمع العلمي استفادة كاملة من التقنيات التي أظهرت في عصر الجينوم، بتطبيق الأساليب الجينومية والنسبية والبروتينية الوظيفية لتحسين تشريح علم وظائف الأعضاء، وعلم الوراثة (Lemos.,2013) .

قام (Jwa., 2019) بدراسة الآثار الوقائية لأوراق المورينجا على تحريض تسوس الأغشية الحيوية بعد تشكيل الأغشية الحيوية الكاروجينية مع بكتيريا اللعاب .

قام كل من (الدوغجي واخرون.، 2015) بدراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية و الايثانولية و الميثانولية لأوراق نبات *Moringa Oleifera* لبعض أنواع من البكتيريا الممرضة للإنسان اثنان منها سالبة لصبغة جرام وهي *Escherichia coli* و *Pseudomonas aerugnosa* و الأخرى موجبة لصبغة جرام وهي *Staphylococcus aureus* كانت النتيجة أن مستخلص الميثانولي لأوراق المورينجا أعلي نسبة للتثبيط لجميع أنواع البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام قيد الدراسة ثم يليه المستخلص المائي ثم المستخلص الإيثانولي .

قام (علي و الآمين .،2019) بدراسة تأثير المضادات الحيوية على بكتيريا معزولة من مرضى تسوس الأسنان و أظهرت الناتج ان لدى بكتيريا *S.mutans* حساسية عالية للمضاد الحيوي Tetracyclin وأيضا وجود حساسية عالية للمضاد الحيوي Chloramphenicol .

قام كل من (Al-Shami *et al*.; 2019) بدراسة تأثير بعض المضادات الحيوية على بكتيريا التسوس *Streptococcus mutans* ، فكانت نتائج حساسية المضادات الحيوية نسبة المقاومة لا يتجاوز 2.3% حيث اظهرت *Streptococcus mutan*s مقاومة عالية ضد المضاد الحيوي Erythromycin ، و كانت حساسة لباقي المضادات الحيوية المستهذفة في الدراسة (Ampicillin , Vancomycin , clindamycin, lincomycin) .

أجريت دراسة على تقيم فعالية 15 مضاداً حيوياً على بكتيريا التسوس *Streptococcus mutans* في الهند ، لتحديد المضاد الحيوي الذي يجب أن يصفه أطباء الأسنان ، حيث كان Ampicillin و Tetracyclin فعالية عالية ضد سلالة المستهدفة بالدراسة (Pranay & Pundir., 2009).

1.3 مواد وطرق العمل:

1.1.3 الأدوات والأجهزة :

تم تجهيز كل متطلبات الأمان الحيوي وذلك لخطورة العينات والمركبات المستخدمة ثم استخدام الأدوات والمعدات والأجهزة التالية :

(جدول 1.) الأدوات والمعدات والأجهزة المستخدمة :

الأدوات و المعدات والأجهزة المستخدمة				
Coat	أطباق بتري	ملاقط	Incubator	حضانة الرجاج
كمامات	مخبار مدرج	ديتول للتعقيم	جهاز الترحيل	Benzene flame
Gloves	ماء مقطر	شمعة	Centrifuge	Light microscope
كحول إيثيلي 97%	أوراق ترشيح	ثلاجة	ميزان كهربائي حساس	قطن طبي
Loops	Flask	Heater	حاضنة ثاني أكسيد الكربون	أكياس عدم بيولوجي
Micropipettes	أنابيب معقمة	Autoclave	جهاز التجفيف	حاملات أنابيب
Tips	أنابيب زجاجية معتمة	Water bath	Hood	Swaps
جهاز قياس الأس الهيدروجيني	Slides	Dimethyl solvo oxide (DMSO) مذيب عضوي		

2.1.3 المواد Materials :

تم اتباع تعليمات شركة (Oxoid) للمنتجات البيو كيميائية لتحضير الأوساط .

الأوساط الصلبة وتشمل :

: Blood agar-1

تم استخدام هذا الوسط لغرض تنقية العينات ومعرفة البكتيريا المستخدمة للدراسة.

: (MHA) Muller Hinton Agar -2

تم استخدام هذا الوسط لغرض اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية المراد اختبارها على عينات الدراسة .

الأوساط السائلة وتشمل :

: Urea broth .1

تم استخدام هذا الوسط لغرض اجراء اختبار تحلل اليوريا التأكيدي لبكتيريا المستخدمة للدراسة .

3.1.3 المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية :

تم استخدام مضادات حيوية معروفة التركيز على هيئة أقراص من إنتاج شركة (oxoid) للمنتجات البيو كيميائية؛ وذلك لأنها الأكثر استخداما في علاج تسوس الأسنان، وكذلك كثرة استخدام هذه المضادات في منطقة الدراسة، ويهدف هذا الاختبار إلى معرفة مدى الاستجابة للبكتيريا قيد الدراسة للمضادات الحيوية .

(جدول 2.) يتضمن المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة :

المجموعة الوظيفية للمضادات الحيوية	اسم المضاد	رمز المضاد	تركيز المضاد بوحدةMcg
b.lactum	Ampenicillin	AM	10 Mcg
Glycopeptide	Vancomycin	VA	5 Mcg
Macroladies	Erythromycim	E	15 Mcg
Tetracyclines	Tetracycline	TE	10 Mcg
Phenicols	Chloramphenicol	C	30 Mcg
Lincosomides	Clindamycin	DA	2 Mcg

4.1.3 العزلات البكتيرية :

عزلت بكتيريا *Streptococcus mutans* من 23 عينة من المرضى المصابين بتسوس الأسنان وذلك في العيادة الخارجية لكلية الأسنان جامعة سبها بتاريخ (2019/10/1) الساعة من 10 إلي 11:30 صباحاً وتم تشخيصها بمعمل الأحياء الجزيئية بقسم علم النبات.

5.1.3 النبات المستخدم في البحث :

استخدم في هذه الدراسة نبات *Moringa oleifera* الذي جمع من منطقة الجديد بمدينة سبها وكانت الأوراق هي الجزء المستهدف بالدراسة .

6.1.3 الوسط الزراعي المستخدم في الزراعة :

تم استخدام Blood agar ،و حضر بأخذ 20 g من الوسط سكب في دورق معقم وأضيف له 500ml ماء مقطر وتم وضعه في حمام مائي وذلك لإذابته، وتم تعقيمه في جهازAutoclave بدرجة حرارة 121c لمدة 15 دقيقة ، و تم التأكد من التعقيم بوضع الشريط اللاصق الخاص بالتعقيم .

وتم تبريده قليلاً ثم أضيف 25 ml من الدم للوسط، ثم تم إضافة 1 ml من المضاد الحيوي (Vancomycin) .

سكب الوسط في أطباق بتري معقمة بعد تصلب الوسط الغذائي تمت عملية التخطيط وحضت الأطباق لا هوائيا في درجة حرارة 37 لمدة 24 ، 48 ساعة (Clinical Microbiology Procedures Handbook 2016).

7.1.3 تحضير المضاد الحيوي :

تم استخدام 1g من المضاد الحيوي Vancomycin في 100 ml من الماء المقطر

(Schiefer& Von Graevenitz., 2006) .

8.1.3 عملية التنقية :

تم تنقية البكتيريا النامية على طبق بتري وذلك من خلال أخذ كل مستعمرة نقية وتنميتها على وسط Blood agar ، وتحضن في درجة حرارة 37 لمدة 24، 48 ساعة (Clinical Microbiology Procedures Handbook 2016).

9.1.3 اختبار صبغة جرام Gram stain test:

1- يتم أخذ قطرة من الماء المقطر و مستعمرة نقية واحدة و وضعهم على شريحة نظيفة ومزجهما مع بعضهما جيدا.

2- ويتم صبغ الشريحة بصبغة Crystal violet لمدة دقيقة وتم غسلها بالماء المقطر.

3- ومن ثم يتم إضافة Iodine solution لمدة دقيقة وتم غسله بالماء المقطر.

4- وبعد ذلك يتم إضافة Ethanol 15 ، 20 ثانية على حسب سمك المسحة ويتم غسله بالماء المقطر.

5- ويتم إضافة Safranin لمدة 30 دقيقة ثم غسله بالماء المقطر.

6- تترك الشريحة لتجف وثم تفحص بالمجهر الضوئي على 10X و من ثم 40X ومن ثم العدسة الزيتية مع إضافة نقطة من زيت السيدر (Clinical Microbiology Procedures Handbook 2016) .

10.1.3 تحضير Urea broth :

تم استخدام وسط اليوريا للتأكد من البكتيريا المستخدمة للدراسة *Streptococcus mutans* حيث تعمل على تحلل اليوريا إلي وتحويلها من اللون الأصفر إلى الوردي.

بأخذ 2.5 g من Urea broth في 250ml من الماء المقطر، ويتم وضعه في حمام مائي ومن ثم تعقيمه في جهاز التعقيم(Autoclave) في درجة حرارة 121c لمدة 15 دقيقة وتم التأكد من التعقيم بوضع الشريط اللاصق الخاص بالتعقيم .

ومن ثم يتم اخذ 25ml من الوسط وإضافة 25ml من اليوريا تركيز 40%

(Schiefer& Von Graevenitz., 2006).

11.1.3 تحضير المستخلصات:

بعد الحصول على عينة النبات الذي ستجرى عليه الدراسة تم تنظيفها وتنقيتها وذلك بغسلها بالماء بلطف لتخليصها من جميع الشوائب والأتربة لغرض الحصول على النبات في أنقى حالاته، ثم تم تجفيف النبات في غرفة جيدة التهوية بعد عملية التجفيف تم سحق أوراق نبات *Moringa oleifera*

باستخدام جهاز المطحنة النظيف والمعقم وبذلك تم الحصول على عينة من مسحوق أوراق نبات *Moringa oleifera* جاهزة للاستخلاص .

تم تحضير المستخلص الكحولي وذلك بأخذ بودرة أوراق *Moringa oleifera* ووزن 30g في 300ml من الكحول المطلق، ووضعها في زجاجة معتمة علي جهاز الرجاج ليلة كاملة في درجة حرارة الغرفة، وبعدها تم وترشيحه بوضعه في ورقة ترشيح ويصب المستخلص حتي يتم ترشيحه بالكامل، وتم تجفيف المستخلص الكحولي في جهاز التجفيف لمدة 4 ساعات في درجة حرارة 76.

وتم تحضير المستخلص المائي بوزن 30g من بودرة أوراق *Moringa oleifera* في 300 ml من الماء المقطر، وتم وضعها في حمام مائي (عفيفي و عطى.، 2003).

12.1.3 تنشيط البكتيريا لاختبار المضادات الحيوية :

تم تنشيط البكتيريا وذلك بزراعتها على طبق بتري حاوي على وسط مغذي Blood agar وتم وضع الأطباق في حضانة حاوية على ثاني أكسيد الكربون، وحضنت في درجة حرارة 37 لمدة 24 ، 48ساعة (Clinical Microbiology Procedures Handbook 2016) .

13.1.3 تحضير وسط Muller hinton agar :

حضر هذا الوسط بأخذ 20g في 500ml من الماء المقطر، وتم وضعه في حمام مائي وذلك لإذابة الوسط، وتم استخدام جهاز (Autoclave) بدرجة حرارة 121 لمدة 30 دقيقة وتم التاكد من التعقيم بوضع الشريط اللاصق الخاص بالتعقيم

. .(Clinical Microbiology Procedures Handbook 2016).

14.1.3 اختبار Mc farland:

تم استخدام هذا الاختبار لقياس مستوى عكارة المعلق البكتيري، حيث تم أخذ 5ml من المحلول الملحي (Normal slain) في أنابيب اختبار وأخذ مستعمرة نقية من البكتيريا ومزجها جيدا بالجهاز الرجاج، حتي تتكون عكارة ويتم مقارنتها ب Mac farlend (McFarland Standard) .

15.1.3 زراعة البكتيريا علي وسط Muller Hinton agar :

تم أخذ مسحة من المحلول الملحي ومسح طبق بتري بالكامل بواسطة صواب ويترك بضعة دقائق وبعد ذلك تم وضع المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

(Schiefer& Von Graevenitz., 2006) .

16.1.3 خطوات عمل اختبار الحساسية للمضادات الحيوية :

1. بواسطة حلقة معدنية يتم أخذ جزء من النمو البكتيري و حقنه في أنبوبة تحتوي على وسط سائل وتحضن على درجة حرارة 35 لمدة 4 ساعات أو أكثر حتي يظهر النمو على شكل عكورة في الوسط ثم تقارن العكورة بمحلول MC-farland المعياري حيث يجب أن يعادل تركيز النمو مقدار نصف تركيز MC-farland المعياري .
2. يتم أخذ جزء من الوسط السائل بواسطة ماسحة قطنية معقمة ويفرد بشكل متساوي على الوسط الصلب وهو Mueller Hinton agar .
3. بواسطة ملقط معدني معقم يتم وضع أقراص المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة على سطح الوسط الزراعي الصلب مع ترك مسافات مناسبة بين قرص و آخر إذ يفضل وضع الأقراص على الوسط الصلب خلال مدة زمنية لا تتجاوز 15 دقيقة بعد النمو عليه حتي لا تتكاثر البكتيريا وتقلل من فعالية المضاد الحيوي .

4. يتم وضع الأطباق مقلوبة في الحاضنة درجة الحرارة 37 درجة مئوية لمدة (18–20) ساعة ثم قراءة النتيجة و ملاحظة التحلل حول أقراص المضادات الحيوية (الطيار،2003) .

17.1.3 تحضير تخفيفات المستخلص الكحولي المستخدمة في الدراسة :

تم تحضير ثلاثة تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي المراد إجراء الدراسة عليه (50mg/ml,75mg/ml, 100mg/ml) وذلك بإضافة مقدار محدد من بودرة المستخلص على كمية مقدار من مادة (DMSO)، وتم استخدام هذه المعادلة لتحضير التراكيز الثلاثة وهي :

$$C1*V1=C2*V2$$

18.1.3 خطوات اختبار التآزري للمستخلص الكحولي لأوراق *Moringa oleifera* مع المضادات الحيوية :

1. تم تخطيط أطباق بتري المحتوية على الوسط الصلب بالبكتيريا بواسطة الماسح القطني .
2. تم احضار المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة وباستعمال ماصة أوتوماتيكية 200ميكرو و تم وضع المستخلص وتشبيع المضادات الحيوية .
3. باستخدام ملقط معقم تم أخذ المضادات الحيوية ووضعها على سطح الوسط، ومن ثم تحضن عند درجة حرارة 37 درجة مئوية من (18–24) ساعة .
4. يتم قياس المنطقة الخالية من النمو البكتيري بواسطة المسطرة وسجلت النتائج

(Leboffe &.Pierce., 2010) (مهنا.، 2008).

19.1.3 خطوات اختبار المستخلص الكحولي لأوراق *Moringa oleifera* على بكتيريا *Streptococcus mutans* :

1. تم احضار أقراص أوراق الترشيح معقمة بقطر 0.5 سم ووضعها في طبق بتري معقم .
2. تم تشبيع أقراص أوراق الترشيح بالمستخلص الكحولي لأوراق *Moringa oleifera* .
3. خططت الأطباق المحتوية على الوسط الصلب بالبكتيريا بواسطة Swap .
4. باستخدام الملقط الذي تم تعقيمه نلتقط أقراص أوراق الترشيح ونضعه على سطح وسط Mueller Hinton agar .
5. وضعت الأطباق في الحضانة في درجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة، وبعد ذلك تم قياس المساحة الخالية من النمو بالمسطرة وتم اخذ النتائج (Leboffe &.Pierce., 2010) (مهنا.، 2008).

20.1.3 خطوات اختبار التآزري للمستخلص المائي لأوراق *Moringa oleifera* مع المضادات الحيوية :

1. تم تخطيط أطباق بتري المحتوية على الوسط الصلب بالبكتيريا بواسطة الماسح القطني .
2. تم احضار المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة وباستعمال ماصة أوتوماتيكية 200ميكرو و تم وضع المستخلص وتشبيع المضادات الحيوية .
3. باستخدام ملقط معقم تم أخذ المضادات الحيوية ووضعها على سطح الوسط، ومن ثم تحضن عند درجة حرارة 37 درجة مئوية من (18–24) ساعة .
4. يتم قياس المنطقة الخالية من النمو البكتيري بواسطة المسطرة وسجلت النتائج (Leboffe &.Pierce., 2010) (مهنا.، 2008).

21.1.3 خطوات اختبار المستخلص المائي لأوراق *Moringa oleifera* على بكتيريا *Streptococcus mutans* :

1. تم احضار أقراص أوراق الترشيح معقمة بقطر 0.5 سم ووضعها في طبق بتري معقم .

2. تم تشبيع أقراص أوراق الترشيح بالمستخلص المائي لأوراق *Moringa oleifera* .

3. خططت الأطباق المحتوية على الوسط الصلب بالبكتيريا بواسطة Swap .

4. باستخدام الملقط الذي تم تعقيمه نلتقط أقراص أوراق الترشيح ونضعه على سطح وسط Mueller Hinton agar .

5. وضعت الأطباق في الحضانة في درجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة، وبعد ذلك تم قياس المساحة الخالية من النمو بالمسطرة وتم اخذ النتائج (Leboffe &.Pierce., 2010).

(مهنا.، 2008) .

22.1.3 طريقة عزل DNA :

تم استخدام Buffers معلومة التركيز على هيئة محاليل من إنتاج شركة

(Vivantis nucleic acid extraction) ، و اتبعت الخطوات المرفقة مع Kit .

23.1.3 التحليل الإحصائي :

بعد الانتهاء من تجميع البيانات الخاصة بالبحث وإدخالها والتحقق من عدم وجود أخطاء بها، تأتي مرحلة تحليل البيانات حيث يحتاج الباحث إلي تحليل البيانات إحصائيا تمهيدا لاستخلاص النتائج منها وتقدير إمكانية تعميمها حيث تم استخدام البرنامج الإحصائي SPSS في تحليل هذه البيانات.

الأساليب الإحصائية المستخدمة:-

اعتمدت هذه الدراسة على الإحصاء الوصفي والاستنتاجي في تحليل البيانات وتم استخدام الأساليب الإحصائية الآتية :-

1. الإحصاء الوصفي وشملت المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والرسومات البيانية.
2. تحليل التباين (ANOVA) لمعرفة الفروق بين أكثر من مجموعتين.

تحليل النتائج باستخدام البرنامج SPSS :

بعد الانتهاء من تجميع البيانات تم تفريغ هذه البيانات وتجهيزها للتحليل الإحصائي باستخدام الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية (SPSS)، وهي عبارة عن مجموعة كبيرة من الاختبارات الإحصائية تبدأ من الإحصاء الوصفي البسيط إلى الإحصاء الأكثر تقدماً مثل اختبارات الفروض وتحليل التباين (الزعبي و الطلافحة.، 2012) .

وتم تقسيم عرض النتائج علي النحو التالي:-

3. نتائج اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية.
4. نتائج اختبار التأثير التآزري للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المورينجا مع المضادات الحيوية.
5. نتائج اختبار التأثير التآزري للمستخلص المائي لأوراق نبات المورينجا مع المضادات الحيوية.
6. مقارنة متوسطات التأثير التآزري للمستخلص الكحولي والمائي لأوراق نبات المورينجا مع المضادات الحيوية .

1.5 الخلاصة :

تم في هذا البحث دراسة تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات *Moringa oleifera* بتراكيز (50mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml) ودراسة تأثير المستخلص المائي لأوراق نبات *Moringa oleifera* و أيضا دراسة التأثير التآزري للمستخلص الكحولي و المائي لأوراق نبات *Moringa oleifera* والمضادات الحيوية (T,C,DA,AM,TE,VA) لعزلة بكتيريا *Streptococcus mutans* .

حيث اوضحت النتائج أن اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لبكتيريا *Streptococcus mutans* *كانت* حساسة للمضادات الحيوية (Ampicillin,Vancomycin,clindamycin,Tetracyclin, Chloramphenicol) ، حيث سجل المضاد الحيوي (Tetracycline) أعلى متوسط للحساسية فكانت 39±6.08 ، و هذا في حين سجل المضاد (Ampicillin) أقل قيمة لمتوسط الحساسية فكانت 16.33±1.15، بينما كانت البكتيريا *Streptococcus mutans* مقاومة للمضاد الحيوي (Erythromycin) .

و عند إجراء اختبار التآزري للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المورينجا أوليفيرا ،حيث اعطى تركيز 50mg/ml مع المضاد الحيوي Erythromycin أعلى متوسط للحساسية فكانت 30±8.66، بينما سجل تركيز 100mg/ml مع المضاد الحيوي Ampicillin أقل متوسط للحساسية فكانت 13.33±1.53 .

أما بالنسبة لاختبار التآزري للمستخلص المائي لأوراق نبات المورينجا أوليفيرا، كانت متوسطات التأثير التآزري للمستخلص المائي مع بعض المضادات الحيوية على بكتيريا *Streptococcus*

mutans ، حيث كان التأثير التآزري للجميع المضادات مع المستخلص المائي ذات متوسطات عالية تتراوح بين 18.33±2.89 إلي 27.33±6.43 بفروق معنوية 0.15 .

في حين أن مقارنة بين متوسطات التأثير التآزري للمستخلص الكحولي و المائي لأوراق نبات المورينجا أوليفيرا مع بعض المضادات الحيوية ، حيث سجل تركيز 50mg/ml مع المضاد الحيوي Erythromycin أعلى متوسط للحساسية فكان 30±8.66 .

في حين سجل تركيز 100mg/ml مع المضاد الحيوي Ampicillin أقل متوسط للحساسية فكان 13.33±1.53.

ومن هذه الدراسة نستنتج أن لمستخلصات المائية والكحولية أوراق نبات المورينجا أوليفيرا *Moringa oleifera* ذات تأثير تآزري مع بعض المضادات الحيوية ، و بذلك اتضخت أهمية مستخلصات أوراق نبات المورينجا كمضادات ميكروبية .

2.5 التوصيات :

أولا : بخصوص البحث :

استناداً على النتائج المتحصل عليها نوصي بالتالي :

1_إجراء دراسة مكملة باستخدام أجزاء آخرى من نبات المورينجا أوليفيرا لمعرفة مدى تأثيرها على البكتيريا المستهدفة بالدراسة .

2_إجراء دراسة مكملة باستخدام أنواع بكتيريا آخرى مسببة للتسوس لمعرفة مدى تأثير مستخلصات نبات المورينجا أوليفيرا عليها .

3_هذه الدراسة شملت ستة أنواع فقط من مضادات الحيوية ، لذا نوصي باختبار مضادات حيوية آخرى لتوسيع معرفة فاعليتها البيولوجية على بكتيريا المسببة للتسوس .

4_هذه الدراسة أقتصرت على التجارب المعملية ، لذلك نوصي بتوسيع الدراسة لتشمل شركات مصعنة لمستحضرات المضادة لتسوس .

5_ نوصي باستخدام تراكيز آخرى من مستخلصات نبات المورينجا أوليفيرا لمعرفة تأثيرها على البكتيريا المستهدفة بالدراسة .

6_التركيز على أهمية النباتات في الحفاظ على الصحة من خلال قدرتها التثبيطية على الميكروبات .

7_نوصي الناس باستعمال المستخلص المائي لأوراق نبات المورينجا أوليفيرا كمضمضة يومية للتخلص من مشكلة التسوس .

ثانيا : بخصوص الامان الحيوي :

1_فهم اجراءات السلامة والأمان داخل المعمل و اتبعاها بشكل صحيح .

2_الاهتمام بدرجة التعقيم ، حيث وجدنا من خلال تجاربنا أن نسبة تلوث مرتفعة لدى بعض المعامل بالقسم .

ثالثا : بخصوص القسم:

تجهيز معمل خاص و توفير النواقص من مواد و أجهزة لطلبة بحوث التخرج .