# الإمكانية المضادة للميكروبات والتقييم الكروماتوجرافي لمستخلصات أوراق

*Azadirachta indicia* A. Juss., Meliaceae

# والدراسات الجينومية للبكتريا المسببة للأمراض


إعداد

أسماء وصل المغامسي

١٨٠٠٤٣٣

إشراف

د. مونزا غول

د. إبتهاج جمبي

كلية العلوم

جامعة الملك عبدالعزيز

المملكة العربية السعودية



١٤٤٤هـ/٢٠٢٢م

# المستخلص

أصبحت مقاومة مضادات الميكروبات تهديدًا خطيرًا لصحة الإنسان في الوقت الحاضر. يهدف هذا البحث لاستكشاف إمكانية استخدام النبات كعامل مضاد للبكتيريا المسببة للأمراض. تم استخلاص أوراق نبتة النيم واختبار فعاليتها ضد سلالات مختلفة من البكتريا الممرضة باستخدام طريقة انتشار الأجار. تم اختبار ثلاثة تراكيز من كل مستخلص: ١٠٠, ٢٠٠, و٥٠٠ ملغ/مل. للبكتيريا موجبة الجرام: أعطى المستخلص الإيثانولي أفضل النتائج المضادة للميكروبات. تم إيجاد أن البكتريا *Bacillus cereus* أكثر حساسية للمستخلص الإيثانولي للنيم عند اختباره بتركيز ٥٠٠ ملغ/مل حيث منع نموها بقطر ٢١,١ ملم. *Bacillus cereus* و*MRSA* أظهروا حساسية أكبر لمستخلص النيم الميثانولي مقارنة بباقي البكتريا الموجبة الجرام عند تركيز ٥٠٠ ملغ/مل حيث منع نمو البكتريا بقطر ١٥,١ملم و١٥,٤ملم، على الترتيب. *Streptococcus pneumoniae* أظهرت مقاومة لمستخلص النيم الميثانولي. ثلاث بكتيريا سالبة الجرام: *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli*، و *S. enterica ser. typhimurium* أظهرت مقاومة لجميع مستخلصات أوراق النيم. كانت أفضل نتائج مضادات الميكروبات لمستخلصات النيم الإيثانولية والميثانولية ضد *Pseudomonas aeruginosa* عند تركيز ٢٠٠ ملغ/مل من كل مستخلص، حيث منعت نمو البكتريا بقطر ١٨,٣ و٢١,٢ ملم، على التوالي. المستخلص المائي لأوراق النيم أعطى نتائج سلبية مع جميع أنواع البكتريا الممرضة التي تم اختبارها. أظهر تحليل الكروماتوجرافيا السائلة عالية الأداء لمستخلصات أوراق النيم وجود حمض البنزويك في المستخلص الإيثانولي للنيم، بينما تم اكتشاف وجود حمض الباراهيدروكسي بنزويك وحمض الفيروليك في جميع مستخلصات أوراق النيم الثلاثة. تم عزل خمس سلالات بكتيرية من التربة وتعريفها بصبغة الجرام حيث وجد أن جميعها موجبة الجرام. تم تعريف البكتريا باستخدام التسلسل الكامل لجين ١٦S rRNA. هذه البكتيريا الخمسة هي: *Bacillus velezensis*، *Bacillus cereus* ATCC 14579، *Bacillus endophyticus* 2DT، *Lysinibacillus pakistanensis*، و *Bacillus paramycoides*. تم اختبار نمو العزلات البكتيرية في الأوساط السائلة ذات الأس الهيدروجيني المختلف، نطاقات الملح المختلفة وبدرجات حرارة مختلفة. لوحظ النمو الأمثل عند الأس الهيدروجيني ٧-٨ و٣٧ درجة مئوية لجميع العزلات. بالنسبة للملح، كان النمو الأمثل مع نسبة ٠٪، ٢٪، و٤٪ كلوريد الصوديوم. أظهرت *Bacillus cereus* ATCC 14579 المعزولة من التربة حساسية لمستخلصات النيم الإيثانولي والميثانولي بتركيز ١٠٠ ملغ/مل مع ١٦,٧ ملم منطقة تثبيط. أكدت هذه الدراسة النشاط المضاد للبكتيريا لأوراق النيم وإمكانية توظيفها في إنتاج عقاقير جديدة مضادة للبكتيريا.

**الكلمات المفتاحية: مضادات الميكروبات، مقاومة المضادات الحيوية، النيم، النباتات الطبية، جهاز الكروماتوجرافيا السائلة عالية الأداء.**

# Antimicrobial Potential and Chromatographic Evaluation of *Azadirachta indicia* A. Juss., Meliaceae Leaves Extracts and Genomic Studies of Potent Pathogenic Bacteria

**By**
**Asmaa Wasl Almaghamsi**

**1800433**

**Supervised By**

**Dr. Munazza Gull**

**Dr. Ebtihaj Jambi**

**FACULTY OF SCIENCES**

**KING ABDULAZIZ UNIVERSITY**

**SAUDI ARABIA**

**1444H / 2022G**

# Abstract

**Antimicrobial resistance has become a serious threat to human health nowadays. This research aimed to explore the potential of plants to be used as antimicrobial agent against pathogenic bacteria. Three different extracts of *Azadirachta indicia* (Neem) leaves (methanolic, ethanolic and aqueous extracts) were tested against 5 Gram-positive bacteria and 4 Gram-negative bacteria. For Gram-positive bacteria, ethanolic extract showed the best antimicrobial potential. *Bacillus cereus* were found more sensitive to ethanolic extract at 500 mg/ml conc. with 21.1 mm zone of inhibition (ZOI). For methanolic extract, at 500 mg/ml conc. *Bacillus cereus* and *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* were found more sensitive with 15.4 mm and 15.1 mm ZOI, respectively. *Streptococcus pneumoniae* were resistant to methanolic Neem extract. Three Gram-negative bacteria: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium* were resistant to all Neem leaves extracts. The best antimicrobial results of ethanolic and methanolic extracts against *Pseudomonas aeruginosa* were at 200 mg/ml conc. of each extract with 18.3 and 21.2 mm ZOI, respectively. Negative results were found for aqueous extract with all tested pathogenic bacteria. HPLC analysis of Neem leaves extracts depicted that benzoic acid was detected in ethanolic extract, while ferulic acid and 4-hydroxy benzoic acid were detected in all three Neem leaves extracts. 16S rRNA gene sequencing were used for identification of five bacteria obtained from soil. These bacteria were identified as: *Bacillus velezensis* (strain FZB42), *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus endophyticus* 2DT, *Lysinibacillus pakistanensis* NCCP-54, and *Bacillus paramycoides* strain MCCC 1A04098. The optimal growth of these bacterial strains was observed at pH 7-8 and at 37°C. The optimal growth of *Bacillus velezensis* and *Lysinibacillus pakistanensis* was with 4%NaCl, while it was with 2%NaCl for *Bacillus cereus* and *Bacillus endophyticus*, and 0%NaCl for *Bacillus paramycoides*. *Bacillus cereus* ATCC 14579 was sensitive to ethanolic and methanolic Neem extracts at 100mg/ml concentration with 16.7 mm ZOI. This study confirmed the antibacterial activity of Neem leaves against these bacterial strains and the possibility of employing this knowledge in new antibacterial drugs development.**



**Key words:** Antimicrobial, Antibiotic resistance,

*Azadirachta indica*, Medicinal plants, HPLC