

دراسة بايولوجية لتأثير مستخلص الحبة السوداء تجاه بعض الصفات الخاصة ببكتريا *E. coli* المحلية

ليث مصلح نجيب، سارة عماد هجول، وجدان أحمد علي وسجي مصلح شويش

كلية العلوم/ جامعة الأنبار

الخلاصة

أجريت الدراسة لمعرفة تأثير الفعالية ضد مايكروبية للمستخلص المائي والكحولي للحبة السوداء وتداخل هذين المستخلصين مع خمسة مضادات حيوية مختلفة تجاه 9 عزلات محلية من *E. coli* المعزولة والمشخصة والمأخوذة من مستشفى النسائية والأطفال في الرمادي ومعرفة تأثير تواجد مستخلص الحبة السوداء وبتراكيز مختلفة في الوسط الزراعي الخاص بالعزلات وتأثير ذلك في استجابة العزلة تجاه بعض المضادات الحيوية. استعملت طريقة الأقراص Disc Diffusion المشبعة لمعرفة تأثير المضادات الحيوية والمستخلص المائي والكحولي وتداخلهما باختبار أقل فرق معنوي، ظهر هناك فرق معنوي في استجابة العزلات لتأثير هذين المستخلصين وتداخلهما مع بعض المضادات الحيوية حيث تميزت العزلة المحلية رقم 4 في استجابتها تجاه تداخل المستخلص الكحولي للحبة السوداء مع المضاد (VA) Vancomycin ليصبح قطر التثبيط 19.5 ملم وتجاه المستخلص المائي ليصبح 17 ملم، بينما كان صفر بغياب المستخلص؛ من جانب آخر أظهرت النتائج اختلاف طرز البروتينات الخلوية بوجود تراكيز مختلفة من المستخلص المائي للحبة السوداء في الوسط الزراعي الخاص بتتمية *E. coli*. تميز هذا الاختلاف باختفاء حزم وظهور حزم بديلة تبعاً لتركيز الحبة السوداء في الوسط الزراعي.

Biological study for effect's of *Nigella sativa* extract on some character's local *E. coli*

L. M. Nageeb, S. E. Hjjwal, W. A. Ali and S. M. Shwash

College of Science/ University of Anbar

Abstract

This study was carried out to know the effect of the activity of antimicrobial of the watery and alcoholic extract that concerns *Nigella sativa* besides the interaction of these two extracts with different five antibiotics against nine local isolate from *E. coli* which are isolated and diagnosed and taken from Ramadi Hospital for Maternity and children. From another aspect, the study aims at knowing the effect of the existence of the extract of *Nigella sativa* with different concentrations within the culture media that regards one of the isolates and the reflection of that on the response of the isolate against some antibiotics. The saturated disc diffusion was used to know the effect of the antibiotics and the watery and alcoholic extract and their interaction by testing the least significant difference. There is a significant difference in the response of the isolates to the effect of these two extracts and their interaction with some antibiotics since the local isolate No.4 is characterized by its response against the interaction of alcoholic extract of *Nigella sativa* with the antibiotic Vancomycin (VA) to make the inhibition zone 19.5 mm and against the watery extract to make the inhibition zone 17 mm taken into account that there is no response when there is only the antibiotic.

المقدمة

استعملت النباتات الطبية ومنها الحبة السوداء في الطب البديل في علاج العديد من الأمراض العضوية وغير العضوية فقد اتجه العلماء في مختلف أنحاء العالم إلى دراستها ومعرفة تأثيراتها وفوائدها الدوائية وذلك لأهميتها من الناحية الاقتصادية والعلمية (1) ومن بين هذه العقاقير الطبية ذات الأصل النباتي والتي شاع استعمالها منذ القدم هي بذور الحبة السوداء *Nigella sativa* أو ما يعرف بحبة البركة (2). وتتكون هذه الحبة من مكونات كيميائية مختلفة ومنها البروتينات التي توجد بنسبة عالية تصل (20-21)% من المحتوى الكلي للحبة (3)، أما الدهون فهي تشكل 35.5% ومنها 1-1.5 زيت عطري (4). أما أهم المواد العلاجية في هذه النبتة فهي مادة الثيموكينون وهي موجودة في الزيت العطري للحبة وتصل نسبتها (18-20)% من وزن الزيت الطيار الذي هو عبارة عن مادة سائلة متطايرة توجد بنسبة 1.5% وله رائحة عطرية وذو لون أصفر فاتح (5) فضلاً عن ذلك فإن هذه الحبة تحوي على الكربوهيدرات حيث تصل نسبتها إلى 18-21% من المحتوى الكلي (3) وتحوي على فيتامينات ومنها B1، B2 و B3 (6) هذا فضلاً عن ذلك فهي تحوي أيضاً على العناصر المعدنية كالسيوم والفسفور والصوديوم والكارصين والكالسيوم والمنغنيز والمغنسيوم (7). ويحتوي زيت الحبة خواصاً مسكنة ومضادة للالتهاب، وهذا يرجع إلى بعض مكونات هذا الزيت كالبراسيمين والثيموكينون (8). ولهذه الحبة القدرة على تثبيط نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام (9)، وتعد بكتريا *E. coli* من أهم الأنواع التي شملتها الدراسات المختلفة لمحاولة زيادة حساسيتها تجاه المضادات الحيوية وبطرق مختلفة أهمها استعمال المواد الطبيعية، وربما السبب في ذلك لقدرتها الامراضية وامتلاكها للعديد من عوامل الضراوة كبعض الصفات المحمولة على البلازميدات منها القدرة الامراضية والمقاومة للمضادات الحيوية وصفة الانتقال والقدرة التزاوجية مما أدى إلى سرعة انتشار السلالات المقاومة للمضادات الحيوية (10)، وبالتالي أصبحت مسببة للعديد من الالتهابات منها التهاب الجروح والحروق والمجاري البولية (11)؛ إن من أهم أشكال مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية تتضمن حماية البكتريا لنفسها من تأثير تلك المضادات تتضمن هذه الحماية تحورات فسلجية مختلفة لحماية جدار الخلية أو غشائها السايوتوبلازمي أو حامضها النووي أو صناعتها للبروتينات (12). وعلى هذا الأساس هدفت الدراسة إلى محاولة زيادة حساسية عزلات بكتريا *E. coli* تجاه المضادات الحيوية باستعمال مستخلص الحبة السوداء ودراسة دوره في تغير بعض الصفات الخلوية الخاصة بالبكتريا.

المواد وطرائق العمل

1. العزل والتشخيص: تم الحصول على العزلات التسعة من مختبر مستشفى النسائية والأطفال في الرمادي أخضعت هذه العزلات لفحوصات تأكيدية تضمنت الزرع على وسط ماكونكي الصلب حيث ظهرت بشكل مستعمرات وردية براقية محدبة قطر المستعمرة 2-3 ملم ذات حافة منتظمة، بينما أظهرت الفحوصات الكيموحيوية بانها سالبة لاختبار الاوكسديز وموجبة للكالتايز متحركة، لا تنتج H₂S، موجبة لاختبار الاندول ولها القدرة على تحويل النترات إلى نترت (12)
- أجري لهذه العزلات اختبار تأكيد التشخيص الكيموحيوي تضمن اختبار Api20E وبالرجوع إلى Analytic Profile Api20E أظهرت النتائج ان جميع هذه العزلات تعود للنوع *E. coli*.
2. تحضير مستخلص الحبة السوداء المائي والكحولي:

- تم تحضير المستخلص الكحولي بسحق 1500 غم من بذور الحبة السوداء *Nigella sativa* باستخدام المطحنة الكهربائية ومزج المسحوق مع 2550 مل من الكحول الايثيلي المخفف 60% وتم وضعها في مكان مظلم لمدة 14 يوم مع الرج المستمر خلال هذه الفترة وبعد انتهاء هذه المدة تم الحصول على المستخلص باستخدام قطع الشاش المعقمة.
- تم تحضير المستخلص المائي بسحق 250 غم من بذور الحبة السوداء *Nigella sativa* والتي شخّصت مسبقاً من قبل معشب كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة الأنبار باستخدام المطحنة الكهربائية ومزج المسحوق مع 500 مل من الماء المقطر ووضعت في مكان مظلم لمدة يوم واحد مع الرج المستمر وتم الاستخلاص باستخدام قطع من الشاش الطبي(13).
- 3. اختبار تداخل المضادات الحيوية مع المستخلص المائي والكحولي:
 - لقح الوسط الزرعي مولد هنتن أكار بالعزلات البكتيرية.
 - شبتت أقراص المضادات الحيوية بالمستخلص المائي والكحولي لمدة ثلاث دقائق باختلاف نسبة تشبع الأقراص حسب نوع المضاد كما في جدول (1).
 - وضعت الأقراص على الوسط الملقح (ثلاثة أقراص لكل نوع من المضادات) القرص الأول: المضاد الحيوي، القرص الثاني: المضاد الحيوي + المستخلص المائي، القرص الثالث: المضاد + المستخلص الكحولي.
 - تم الحضان بدرجة الحرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة.
 - لوحظ تكون هالات (Zones of inhibition) حول الأقراص للمعاملات الثلاث وقيس قطر التثبيط المتكون بالمسطرة بوحدة ملم.

جدول (1) يوضح تشبع أقراص المضادات الحيوية بالمستخلص المائي والكحولي للحبة السوداء

نوع المضاد	التركيز mcg	التشبع بالمستخلص المائي للحبة السوداء (mg)	التشبع بالمستخلص الكحولي للحبة السوداء (mg)
E (Erythromycin)	15	22	16
VA (Vancomycin)	10	38	19
CN (Gentamycin)	30	31	21
F (Nitrofurantion)	100	38	20
C (Chloramphenicol)	10	32	22

- 4. تأثير وجود مستخلص الحبة السوداء في الوسط الزرعي السائل: حضر وسط المرق المغذي السائل الحاوي على تراكيز مختلفة من مستخلص الحبة السوداء (10، 20، 30، 40)% المحضر في نقطة (2) لقت هذه الأوساط بالإضافة إلى القياسي بالعزلة المحلية رقم (3) المحلية وبعد فترة حضان 24 ساعة في 37 م° وبطريقة الأقراص أجري اختبار فحص الحساسية للمزارع المايكروبيية تجاه المضادات التالية: Imipenem (IPM)، Ampicillin/ Amoxicillin/ Clavulanic acid (AMC)، Cefotaxime (CTX)، Ciprofloxacin (CIP)، (APX) Cloxacillin.
- 5. دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي في الوسط الزرعي على طرز البروتينات البكتيرية: رسبت الخلايا الناتجة في الفقرة 4 باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة ولمدة 30 دقيقة بعد غسلها عدة مرات بالماء المقطر، سحقت الخلايا الراسبية ورحل المستخلص على هلام متعدد الأكر أمايد حيث هيء هلام الفصل بتركيز 10% وهلام الرص بتركيز 5% وصيغ بصبغة Coomassie Brilliant blue- R250 وحسب الطريقة الواردة في (14).

النتائج

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي الخاصة بدراسة دور المستخلص المائي والكحولي في زيادة فعالية المضادات الحيوية أن هناك تباين في الفروق المعنوية وتبعاً لنوع المضاد أو نوع العزلة المحلية فقد أظهرت النتائج أن هناك زيادة عالية في حساسية العزلات تجاه المضادات الحيوية المشبعة بالمستخلص المائي أو الكحولي بالمقارنة مع حساسية العزلات تجاه المضادات الحيوية لوحدها وخصوصاً في معدل نتائج المضاد (VA) بالتداخل مع المستخلص الكحولي حيث ازداد معدل التثبيط العام للعزلات من صفر ملم لغاية 10.5 ملم في حين لم يسجل معدل التثبيط الخاص بالمستخلص المائي فرق معنوي واضح أما في النتائج الخاصة بمعدل التثبيط الناتج من استعمال المضاد (F) بالتداخل مع المستخلص المائي فقد ازداد معدل التثبيط من 17.94 ملم لغاية 22 ملم وكانت هذه الزيادة واضحة في نتائج العزلات ذات الرقم المحلي (7، 8) حيث ازداد معدل التثبيط من (16، 17) ملم لغاية (22، 23) ملم على التوالي في حين لم يكن الفرق معنوي وبشكل واضح تجاه استجابة العزلات لتداخل المضاد الحيوي C و E مع المستخلص المائي والكحولي للحبة السوداء (جدول 2).

من جانب آخر أظهرت نتائج وجود تراكيز مختلفة من مستخلص الحبة السوداء في الوسط الزراعي الخاص بالعزلة المحلية *E.coli* أن هناك تباين في استجابة العزلات تجاه مختلف المضادات الحيوية حيث ازداد قطر التثبيط وتبعاً لنوع المضاد فبالوقت الذي لم يكن المضاد GTX فعالاً تجاه العزلة المنمأة في وسط المرق المغذي ازدادت الفعالية ليكون قطر التثبيط 13 ملم بالوسط الحاوي على 40% من مستخلص الحبة السوداء أما المضاد Cip فقد ازدادت الفعالية من 28 ملم لغاية 42 ملم (جدول 3).

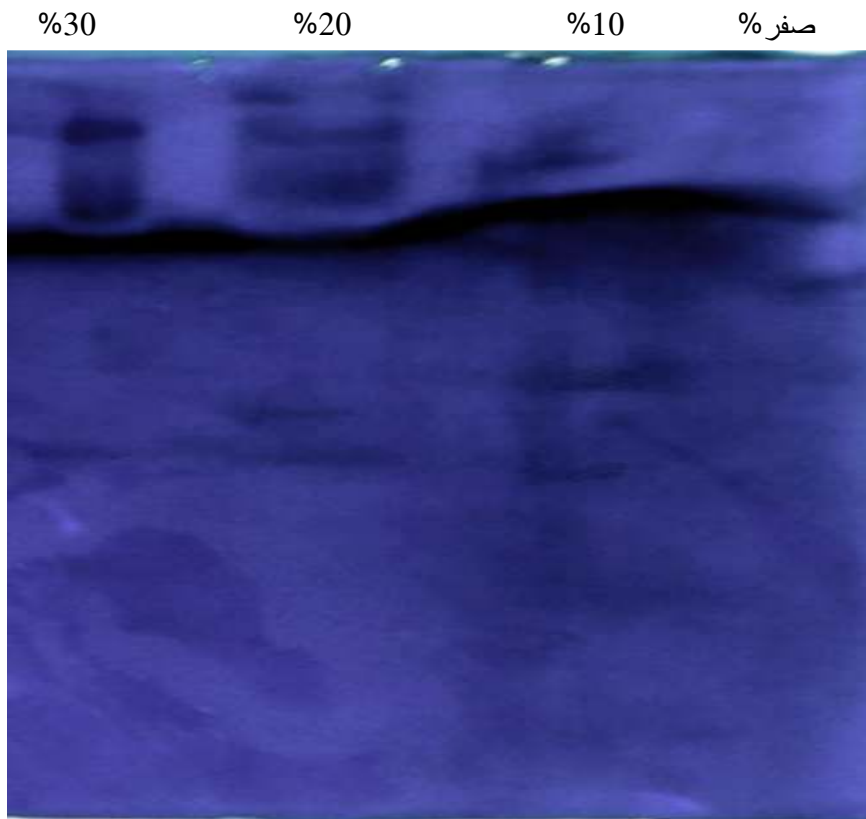
جدول (2) تأثير تداخل المستخلص المائي والكحولي للحبة السوداء مع بعض المضادات الحيوية تجاه حساسية عزلات *E. coli* المحلية

L.S.D.	المعدل	F (Nitrofurantion)									المعاملة
		9	8	7	6	5	4	3	2	1	
Treat.= 1.76 Isolate= 3.1	17.94	18.5	17	16	21	19	18	22	13	17	control
	19.78	21	23	19	21	19	17	18	18	22	Alcoholic
	22.00	23	23	22	24	22	20	25	18	21	Aquatic
		20.83	21.00	19.00	22.00	20.00	18.33	21.67	16.33	20.00	المعدل
	المعدل	C (Chloramphenicol)									المعاملة
Treat.= 1.3 Isolate= 2.2		9	8	7	6	5	4	3	2	1	
	19.28	21	0	24	23	24	22	26	15	18.5	control
	19.78	19	0	27	20	24	22	25	18	20	Alcoholic
	17.61	19	0	25	17	21.5	20	22	15	19	Aquatic
	20.67	0	25.33	20.00	23.17	21.33	24.33	16.00	19.17	المعدل	
	المعدل	E (Erythromycin)									المعاملة
Treat.= 2.8 Isolate= 4.8		9	8	7	6	5	4	3	2	1	
	2.11	0	0	0	0	0	19	0	0	0	control
	3.11	0	0	0	0	0	19	0	0	9	Alcoholic
	4.44	0	0	0	0	0	19	12	0	9	Aquatic
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.00	4.00	0.00	6.00	المعدل
	المعدل	CN (Gentamycin)									المعاملة
Treat.= 3.4 Isolate= 5.9		9	8	7	6	5	4	3	2	1	
	10.22	0	17	16	10	10	10	14	12	12	control
	13.72	0	18	16.5	15.5	13.5	21	14	13	12	Alcoholic
	11.56	0	20	15	13.5	8.5	18	8	9	12	Aquatic
	0	18.33	15.83	10.00	10.67	16.33	12.00	11.33	12.00	المعدل	
	المعدل	VA (Vancomycin)									المعاملة
Treat.= 2.2 Isolate= 3.8		9	8	7	6	5	4	3	2	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	control
	10.50	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	15.5	19.5	8.5	8.5	Alcoholic
	0.78	0	0	0	0	0	0	17	0	0	Aquatic
	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	2.83	5.17	8.83	2.83	2.83	المعدل

جدول (3) تأثير تداخل المستخلص المائي في الوسط الزرعى تجاه حساسية (ملم) عزلة *E. coli* 3 المحلية

MC	AM	APX	CTX	Imp	Cip	
0	0	0	0	25	28	Control
0	0	0	10	28	35	10%
0	0	0	11	28	35	20%
0	0	0	12	28	40	30%
0	0	0	13	28	42	40%

بينما أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لمستخلص الخلايا النامية في تراكيز مختلفة من المستخلص المائي للحبة السوداء (صفر، 10، 20، 30) %، أن هناك تباين في الطرز البروتينية بالمقارنة مع الأصلية (المعاملة صفر) تميز هذا التباين بظهور حزم بروتينية في مستخلص الخلايا النامية بالمعاملة 10% من مستخلص الحبة السوداء واختفاء حزم مع ظهور حزم جديدة في هلام الرص الخاص بمستخلص الخلايا النامية بالمعاملة 20، 30% (صورة 1).



صورة (1) تمثل الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الأكريل أميد لمستخلص الخلايا النامية بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي للحبة السوداء

المناقشة

تتفق نتائج الدراسة مع ما وجدته (9) في أن لمستخلص الحبة السوداء فعالية تآزرية Syrengism مع المضادات الحيوية Erythromycin و Gentamycin و Streptomycin و Ampicillin و Spectinomycin، وتتفق الدراسة مع ما وجدته (15) بان استعمال مستخلصات خام للحبة السوداء ضد العزلات المقاومة للمضادات الحيوية ووجد بانها ذات تأثير مثبت لنمو البكتريا وفسر ذلك بسبب احتوائها على القلويدات الخام، كذلك اتفقت الدراسة مع ما ذكره (5) بان للمستخلصات الكحولية للحبة السوداء القدرة على الفتك بالجراثيم مثل الاشريشية الكولونية والزائفة الزنجارية، حيث كانت اغلب عزلات *E. coli* حساسة للمستخلص الكحولي للحبة السوداء. فسر (11) دور المضادات الحيوية بان المضادين في (Erythromycin ، Chloramphenicol) يؤثران على نمو البكتريا والسبب يعود إلى تثبيط تخليق البروتين والأحماض النووية، وهذا التأثير من خلال ارتباطهما مع المجموعة الثانوية 50s ومن بعد يتوقف تخليق البروتين أو الحامض النووي وبكتريا *E. coli* تكون مقاومة للمضاد (Erythromycin) وذلك يرجع لعدم قدرة هذا المضاد إلى النفاذية عبر الغشاء البلازمي للخلية البكتيرية، أما تأثير المضاد (Vancomycin) على نمو البكتريا فهو من خلال تثبيط تخليق مادة Peptidoglycan التي تشكل المادة الرئيسية في جدار الخلية البكتيرية (12) وهذا يفسر مقاومة البكتريا لهذا المضاد لأنها تحوي على طبقة خارجية Outer membrane وبالتالي صعوبة اختراق هذا المضاد لهذه الطبقة وعدم وصوله إلى موقع الهدف هذا فضلاً عن ذلك فان للمواد الطبيعية الأخرى تأثيراً مضاداً للبكتريا مشابهاً للحبة السوداء ومن هذه المواد العسل، حيث أن الحموضة العالية للعسل تلعب دوراً مهماً في النظام الذي يمنع النمو البكتيري حيث أن pH العسل يتراوح بين 3.5-4.5 (معدل pH=3.9) جاعلاً إياه مكان غير ملائم لنمو أغلب البكتريا والعسل يحوي على نظام تثبيط مضاد للبكتريا. والنحل يضيف أنزيم Glucose oxidase للعسل وهذا الإنزيم يتفاعل مع Glucose لإنتاج Peroxidase و Pluconic acid وكلاهما مضاد للبكتريا (16)؛ من جانب آخر اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود تباين في شكل وأعداد الحزم البروتينية؛ تتفق نتائج الدراسة مع ما وجدته (16) وفسر ذلك بأن المايكروبات تبدأ بشكل مباشر بتغيير بعض الفعاليات الأيضية والبنائية الخاصة بالبروتينات والدهون وحسب الطرف المسلط بينما فسر (17) ذلك بأن البكتريا تحتاج إلى أنواع مختلفة وجديدة من البروتينات وتبعاً للظروف المحيطة.

المصادر

1. الجبوري، محمد عبد الله والراوي، علي عواد. 1993. علم الأدوية الطبيعية- جامعة بغداد.
2. الهلالي، إخلاص علي حسين. 2002. تأثير مستخلص بذور الحبة السوداء *Nigella sativa* في خصوبة ذكور الفئران البيض وبعض معايير الدم الفسلجية. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة الكوفة.
3. Al-Kiasy, M. J.; Baqir, A. W. & Al-Ani, A. H. 1999. Chemical composition of the black cumin *Nigella sativa*. L – seed growing Iraq. Ibn Hiatham for Pure and App. Sci., 12 (2):1- 8.
4. الدجوي، علي. 1996. موسوعة النباتات الطبية والفطرية، مكتبة مدبولي- القاهرة.
5. خليفة، حسن. 2012. جنة الأعشاب، دار الأسرار للنشر والتوزيع- عمان.
6. Nergiz, C. & Ötles, S. 1993. Chemical composition of *Nigella sativa* L- seeds. Food Chem., 48 (3): 259- 261.
7. Al-Jasser, M. S. 1992. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. . Food Chem., 45 (4): 239- 242.

8. باموسى، عبد الله عمر. 2005. الحبة السوداء. كلية الطب. جامعة الملك فيصل.
9. Hanafi, M. S. & Hatem, M. E. 1991. Students on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seeds (black cumin). J. Ethnopharmacol., 34 (2): 275- 278.
10. الطائي، هيام عادل. 2000. مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية وانتاج أنزيمات بيتا لاكلتاميز. مجلة الدواء العربي. 2: 15- 16.
11. الجبوري، محييد مد الله. 1990. علم البكتريا الطبية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - جامعة بغداد.
12. حداد، جاسب جاسم. 1991. علم الأحياء المجهرية البيطرية. مطبعة الحكمة للطباعة والنشر، الموصل - العراق.
13. احمد، سندس حميد؛ عبيد، جنان علي وعبد، حميد عودة. 2011. فعالية المستخلص الخام لبذور نبات اقطنونيا المحلية *Plantago ovata*. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة. 5 (1): 35- 42.
14. محمد؛ خلف جاسم؛ نجيب، ليث مصلح ومطر، ثامر يوسف. 2011. تأثير درجة الحرارة على طرز البروتينات في بكتريا *Lactococcus lactis*. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة. 5 (1): 1-4.
15. Morsi, N. M. 2006. Antimicrobial effect of crucle extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics resistant bacterial. Acta Microbial., 49 (1): 63- 74.
16. Hassanein, S. M.; Gebreel, H. M. & Hassan, A. A. 2010. Honey compared with some antibiotics against bacteria isolated from burn-wound infections of patits in Ain Shams University Hospital. Ain Shams University, Cairo, Egypt, 6 (10): 305.
17. Gottschalk, G. 1978. Bacteria metabolism. Springer. New York.