



دراسة تأثير مستخلصات الحبة السوداء على مقاومة العزلات المرضية لبكتيريا *Klebsiella*

وجدان احمد علي

جامعة الانبار / كلية العلوم

الخلاصة:

يتضمن البحث دراسة تأثير تداخل مستخلص الحبة السوداء *Nagilla sativa* المائي والكحولي في تثبيط نمو عزلات محلية تابعة للجنس *Klebsiella* والمعزولة من حالات مرضية مختلفة بالتدخل مع بعض المضادات الحيوية (VA) (E), Vancomycin (CN), Gentamycin (CN), Erythromycin (E), Disc diffusion (VA) (C), Chloramphenicol (C), Nitrofuran (F), Nitrofuran (F), Chloramphenicol (C), Nitrofuran (F). ذلك تم دراسة تأثير وجود تركيز مختلف من المستخلص المائي للحبة السوداء ضمن الوسط الزرعي الخاص بنمو العزلة *Klebsiella pneumoniae*. ذات الرقم المحلي (1) ومدى انعكاس ذلك على حساسية نموها تجاه عشرة أنواع من المضادات الحيوية المختلفة. استعملت طريقة الانتشار في الأقراص Disc diffusion لدراسة الفعالية التثبيطية الناتجة من تداخل المستخلص المائي والكحولي مع المضادات الحيوية إذ أظهرت النتائج أن تداخل المستخلص المائي أو الكحولي فرق معنوي في زيادة فعالية بعض المضادات المستعملة خصوصاً المضاد (VA) إذ ازدادت فعاليته تجاه العزلة المحلية رقم (1) من صفر إلى ١٩ و ١٩,٥ ملم للمستخلص المائي والكحولي على التوالي وسلكت العزلة نفسها سلوك مشابه تجاه المضاد (E) إذ ازدادت فعالية هذا المضاد من صفر إلى ١٠ أو ١٥ ملم. من جانب آخر وبشكل عام أظهرت النتائج أن بزيادة تركيز المستخلص المائي للحبة السوداء في الوسط الزرعي الخاص بنمو العزلة المحلية رقم (1) يزداد حساسيتها تجاه بعض المضادات خصوصاً الاموكسيلين.

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠

تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦

تاريخ النشر: ٢٠٢٢ / /

DOI: 10.3765/juaps.2017.176977

الكلمات المفتاحية:

تتكون من (٣١-٣٥,٥)% زيت، (١٦-١٩,٩)% بروتين، (٣٣-٣٤)% كاربوهيدرات، (٤,٥-٤,٥)% الياف، (٣,٧-٣,٧) رماد، (٠,٠١٣) صابونين، (٥,٧-٥,٧)% رطوبة (٣) كذلك تحتوي على القلويدات، وغذائيه بالفلافونيدات والتانينات والاحماض الدهنية الاساسية والاحماض الامينية وحامض الاسكوربيك (٤,٥,٦,٧) كذلك تحتوي على عدد من العناصر (٠,٥-٠,٥) كالسليوم، (٠,٦-٠,٦)% فوسفور، (٠,١-٠,١)% بوتاسيوم و (٠,١-٠,١)% صوديوم (٨). تنتشر في شرق وغرب ووسط آسيا، إفريقيا، أوروبا، كما تنتشر في تركيا، سوريا، العراق، السعودية العربية (٩) تمتلك الحبة السوداء أهمية طبية عالية تجاه البكتيريا، الفطريات، الفايروسات، الطفيليات، إذ تمتلك فاعلية مضادة للالتهابات، مضادة للحساسية، مضادة للأكسدة، مضادة للسرطان، مضادة للبكتيريا، مضادة للطفيليات، مضادة للفايروسات، مضادة للطفيليات، إذ تمتلك مواد للفطريات، مضادة للفايروسات، مضادة للطفيليات، إذ تمتلك مواد فعالة التي يجعلها تمتلك خواص علاجية. (١٠، ١١، ١٢)

المقدمة:

تعود الحبة السوداء إلى عائلة Ranunculaceae إذ عرفت لأول مرة وووصفت من قبل العالم لينيوبس في (١٧٥٣) (١) يظهر نبات الحبة السوداء بشكل متفرع يصل ارتفاعه إلى (٤٠-٧٠) سم. تظهر بشكل اوراق متبادلة الترتيب، ازهارها بيضاء، تحتوي على محفظة مملوءة ببذور سوداء يتراوح طولها من (٣,٥-٢,٥) ملم وعرضها (٢,٥-١,٥) ملم. هذه النباتات معروفة بكل الاقطار العربية وتحمل تسميات متعددة اذ تعرف حبة البركة، الحبة السوداء، والكمون الاسود (٢) اما التركيب الكيميائي لبذور الحبة السوداء فقد عرف منذ عام ١٨٨٠، اذ

*Corresponding author at: College of Science, University of Anbar Ramadi, Iraq Ramadi : Iraq;
E-mail address: dean_coll.science@yahoo.com

وإجراء اختبار الاندول وفوكاس بروس كاول واختزال السترات (٢٥) أما العزلة المحلية ذات الرقم (١) والتي تم إجراء عدة اختبارات عليها كاختبار تأثير تراكيز مختلفة من الحبة السوداء على المحتوى الكيمياوي الخلوي واختبار تأثير وجودها في الوسط الزرعي على حساسيتها تجاه المضادات الحيوية فقد تم إجراء الفحص التشخيصي لهذه العزلة والتأكيدي وذلك باستعمال جهاز Vitek في مستشفى الفلوجة العام والذي أوضح عائديتها للنوع *Klebsiella pneumonia*.

- تحضير المستخلص المائي والكحولي للحبة السوداء: تم تحضير المستخلص المائي والكحولي وحسب الطريقة الواردة في (٢٦) ثم رشح خلال فلاتر ترشيح خاصة وزرعت عينة منه على وسط Neutriant agar للتأكد من خلوه من المايكروبات أما المستخلص الكحولي فقد حضر بنفس الطريقة مع ملاحظة أن الكحول المستعمل هو كحول أثيلي مخفف ٦٠% وان فترة الرج استمرت ٤ أيام.

- اختبار حساسية نمو البكتيريا تجاه تداخل مستخلص الحبة السوداء مع بعض المضادات الحيوية: تم إجراء هذا الاختبار عن طريق تبييع أقراص المضادات التالية: Vancomycin (VA) 10mg, Nitrofurantion (F) 10 mg, Gentamycin (CN) 30 mg وذلك باضافة كمية ٥.٠ مايكروليتر من المستخلص المائي أو الكحولي المحضر ثم بطريقة النشر تم تلقيح الوسط الزرعي أكار مولر هنتون (Muller Henton agar) بالفاصح المنشط والذي لا يزيد عدد الخلايا عن 10⁵C.F.u/ml والمعروفة في الفقرة السابقة بعد ذلك وضعت الأقراص المشبعة والغير مشبعة (قياسية) على سطح الأطباق الملقحة وحضنت لمدة ٤٨-٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧.٣° م.

- اختبار حساسية نمو البكتيريا النامية بالوسط الزرعي الحاوي على تراكيز مختلفة من مستخلص الحبة السوداء المائي تجاه بعض المضادات الحيوية: تم اختبار حساسية العزلة المحلية ذات الرقم (١) والشخصية بها *Klebsiella pneumonia* والنامية بالوسط الزرعي الحاوي على تراكيز مختلفة من المستخلص المائي للحبة السوداء صفر، ٢،٥، ١٠، ٥، ١٥% وبطريقة الانتشار بالأقراص (Discdiffusion) وعلى وسط أكار مولر هنتون اختبرت حساسيتها تجاه بعض المضادات Ciprofluxacin(Cip) 10mg Cefatrixon (CRO) 30mg; Trimethoprim (TMP) 5mg; cefexime(CF) 30mg; Akamycin (AK) 10Mg; CefalTaxim(CTX) 10mg; Gentamycin(CN) 10mg; Refadin(RA)

Klebsiella هي بكتيريا لا هوائية اختيارية غير متحركة عصوية سالبة لصبغة گرام لها القدرة على تكون المحفظة (١٣)؛ تعد فلورا طبيعية في أمعاء الإنسان والحيوان (٤) لها القدرة على إحداث أمراض مختلفة كالتهاب السحايا والقصيبات وتسمم الدم وذات الرئة والتهاب المجاري البولية (١٥، ١٦) شائعة الاصابة في اروقة المستشفيات والأشخاص المصابين بضعف المناعة الناتج من أمراض مختلفة وهي الأكثر شيوعاً في الخيول والأغنام (١٤) وأن ما يساعد انتشارها هو الماء الذي يعد المصدر الأساسي لنrowth الأغذية البحرية (١٧، ١٨) وكذلك بعد المصدر الأساسي لإصابة الأطفال الرضع المعتمدين في رضاعتهم على الحليب المحضر صناعياً. إضافة إلى انتشارها الواسع في الخضراء (١٩). تعد المحفظة من أهم عوامل الضراوة المساعدة في التصاقه ببكتيريا *Klebsiella* بالسطح وبالتالي استيطان الهدف (٢٠) وإن مستوى تعقيد مكوناتها يؤدي إلى تحفز استجابة الجهاز المناعي بإنتاجه الأجسام المضادة (المتضدد K) بالإضافة إلى ذلك تحتوي *Klebsiella* المستضد الجسمي (٢٠). أوضح الباحث (٢١) إلى ان قدرة *Klebsiella* على الالتصاق وبالتالي استيطانها لتلك السطوح ناتج من قدرتها على إنتاج مواد حيوية تطرح للخارج (Biofilim) تعمل هذه المواد على زيادة قدرة الالتصاق وبالتالي توطنها وزيادة ضراوتها؛ وأشار الباحث (٢٢) إلى أن المحفظة والغشاء الحيوي في بكتيريا *Klebsiella* يعملان على تقليل الاستجابة المناعية وبالتالي زيادة ضراوتها خصوصاً تجاه *Klebsiella* الاستجابة للمضادات الحيوية. إن الالتهابات الناتجة بفعل *Klebsiella* تعالج عادةً باستعمال المضادات الحيوية المختلفة وأن عدم اتباع الطرق المدروسة في إعطاء وتناول العلاج أدى إلى ظهور أنواع مقاومة متعددة للمضادات المستعملة (٢٣) مما حدى بالعديد من الباحثين إلى المحاولة في مواجهة ذلك بالعديد من الطرق كإيجاد أنواع جديدة من المضادات أو إيجاد وسائل أخرى كاستعمال بعض المواد الطبيعية ذات الفعل المؤازر لعمل بعض المضادات فقد أوضح الباحث (٢٤) زيادة حساسية عزلات *E. coli* تجاه بعض المضادات الحيوية خصوصاً الفانкомايسين المشبع بمستخلص الحبة السوداء (المائي أو الكحولي)، وأن وجود تراكيز مختلفة من الحبة السوداء في الوسط الزرعي يؤدي إلى زيادة استجابة العزلات قيد الدراسة تجاه المضادات المستعملة.

المواد وطرق العمل:

- عزلت بكتيريا *Klebsiella* من مختبرات مستشفى الفلوجة العام ومختبرات مستشفى النسائية والأطفال في مدينة الرمادي وتم التأكد من عائديتها للجنس *Klebsiella* بإجراء عدة اختبارات زرعية ومايكروسكوبية وببايكيمياتية أهمها الزرع على الاوساط الخاصة كوسط Mackonkey agar والصبغ بصبغة گرام

تركيز المعاملة في الوسط الزرعي في حين لم يكن هناك أي استجابة واضحة في زيادة الحساسية تجاه المضادات الأخرى المستعملة (جدول ٢).

جدول (١) حساسية ستة عزلات محلية من بكتيريا *Klebsiella* تجاه تداخل ٥٠ مايكروليتر من المستخلص المائي والكحولي للحبة السوداء مع بعض المضادات الحيوية (قطر التثبيط ملم)

العاملة	العزلة	العاملة	العزلة	النوع		L.S.D ^٣	المعدل
				العاملة	العزلة		
١,٥٠	١,٣٢	٢,٥٢	٣,٥١	١,٦٢	١,٨٥	١,٠٥	١,٨٧
٢,١	٢,٢	٢,٣	٢,٤	٢,٥	٢,٦	٢,٧	٢,٨
٢١	٢٠,٢	٢٠,٢	٢٠,٢	٢٠,٢	٢٠,٢	٢٠,٢	٢٠,٢
٢٧	١٩	٠	٠	٠	١٢,٣	٩	١٤
٢٣	٢٣	٠	٠	٠	٢٤,٧	٢٧	٢٦
١٦	١٦	٦,٣	٩	١٠	٠	١٩,٣	١٨
٢٢	٢١	١٥,٨	١٦,٥	١٦	١٥	١٧,٧	١٦
٠	٠	٢٠,٧	٢٣	١٧	٢٢	٢٤	٢٣
١٦	١٦,٥	٨,٣	١٥	١٠	٠	١٨	١٨
C	E	CN	F	VA	الماء	العازل	L.S.D ^٣
					العاملة	العزلة	المعدل
					قياسية	كحولي	مائي
					العاملة	العزلة	المعدل
					قياسية	كحولي	مائي
					العاملة	العزلة	المعدل
					قياسية	كحولي	مائي
					العاملة	العزلة	المعدل

١٠mgAmoxycilin(Ax) ٢٥mg;Ampiclox (AMC)
mg ١٠. وحسب الطريقة الواردة في (٢٤).

النتائج

أظهرت نتائج نمو العزلات البكتيرية على الوسط الزرعي ماكونكي أكار بأنها تنمو على شكل مستعمرات مرتفعة عن الوسط ذات قطر ٤ - ٧ ملم وردية مخاطية القوام سالبة لاختبار الاندول ومحبطة لفحص فوكاس بروس كاور والكتاليز واليوريز وأظهر التشخيص باستعمال جهاز Vitek أن العزلة رقم (١) تعود لنوع *Klebsiella pneumonia*.

- نتائج اختبار حساسية نمو العزلات البكتيرية تجاه تداخل مستخلص الحبة السوداء المائي والكحولي مع بعض المضادات الحيوية: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي ان هناك تبايناً في الفروق المعنوية الخاصة بنتائج تداخل المستخلص المائي أو الكحولي مع المضادات الحيوية تجاه نمو عزلات بكتيريا *Klebsiella*. فقد أظهرت النتائج أن لتدخل المستخلص المائي أو الكحولي مع المضاد (VA) أن هناك فرق معنوي عالي في زيادة حساسية العزلات تجاه المعاملة بالمقارنة مع السيطرة من جانب آخر أظهرت النتائج أن هناك فروق معنوية في زيادة حساسية العزلات تجاه تداخل المستخلص المائي مع المضاد (F) في حين لم تكن الفروق معنوية تجاه تداخل باقي المعاملات؛ تميزت العزلة (١) في استجابتها لتأثير المعاملة إذ أظهرت نتائج الحساسية ارتفاع معدل قطر التثبيط من صفر في مجموعة السيطرة (المضاد لوحده) ليبلغ ١٩,٥ ملم و ١٩ ملم كنتيجة لتدخل المستخلص الكحولي أو المائي مع المضاد (VA) على التوالي تلتها العزلة رقم (٣) تجاه نفس المضاد إذ بلغت ٨,٥ و ١٤ ملم بعد أن كانت صفرًا في حين تباين استجابة العزلات الأخرى وتبعاً لنوع المضاد (جدول ١).

- اختبار حساسية نمو البكتيريا النامية بتراكيز مختلفة من الحبة السوداء تجاه بعض المضادات الحيوية: أظهرت النتائج ان لوجود تراكيز مختلفة من المستخلص المائي للحبة السوداء تأثير متبادر في حساسية نمو العزلة المحلية (١) والمشخصة بـ *Klebsiella pneumonia* (Cip, AK, CRO, CTX, TMP, CN, RA, CFE, AX, AMC) حيث أظهرت النتائج ظهور فعالية للمضاد اموکسیلین وخصوصاً في المعاملة الحاوية على (١٥ و ٢٠ %) مستخلص مائي إذ بلغ قطر التثبيط ١٢ و ١٧ ملم على التوالي بالوقت الذي لم تظهر أي نتيجة موجبة في المعاملة القياسية كما أظهرت النتائج زيادة فعالية كلاً من المضاد (CN) و (AK) وبشكل طردي مع زيادة

	عالي	20	22	24	0	العدي
	19.3	20	25	22	0	
	18.3	29	18	22.3	0	23.3
						المعدل

جدول (٢) حساسية المضادات الحيوية للبكتيريا *Klebsiella* النامية في الوسط الزرعي *N. broth* والحاوي تراكيز مختلفة من مستخلص الحبة السوداء المائي

Antibiotic Isolate \	CIP	AK	CRO	CTX	TMP	CN	RA	CFE	AX	AMC
Control	0	1	0	0	0	9	0	0	0	0
2 . 5 %	0	17	0	0	0	11	0	0	0	0
5 %	0	17	0	0	0	11	0	0	0	0
1 0 %	0	18	10	0	0	11	0	0	12	0
1 5 %	0	19	10	0	0	11	0	0	17	0

المناقشة :

أظهرت نتائج الدراسة لمستخلص الحبة السوداء تأثيرات مختلفة على استجابة العزلات البكتيرية قيد الدراسة سواءً منها تجاه استجابتها وبالتدخل التآزرى للمضادات الحيوية أو من خلال وجود المستخلص ضمن الوسط الزرعي الخاص بالعزلة قيد الدراسة وانعكاس ذلك على استجابتها للمضادات الحيوية فقد أظهرت النتائج ان هناك فعالية تآزرية لمستخلص الحبة السوداء المائي والكحولي مع المضادات في تثبيط نمو بكتيريا *Klebsiella* وخصوصاً بالتأزر مع المضاد الفانكومايسين وبتأثير معنوي وفي نفس الوقت ان وجود مستخلص الحبة السوداء المائي ضمن مكونات الوسط الزرعي الخاص ببكتيريا *Klebsiella pneumoniae* يؤدى إلى زيادة استجابة العزلة لبعض المضادات وخصوصاً الاموكسيلين تتفق نتائج الدراسة مع ما وجده (٢٧) والذي أوضح أن الأفراص الورقية المشبعة بمستخلص الحبة السوداء يؤدى إلى تثبيط نمو بعض الأنواع المايكروبوبية أهمها السالبة لصبغة كرام وأن بكتيريا *Klebsiella* تعد الأكثر تأثراً وفي نفس الوقت أن لهذا المستخلص فعالية تآزرية مع بعض المضادات الحيوية وفسر (٢٨) سبب ذلك هو احتواء هذه المستخلصات على القلويات أو الشاموكيون (٢٩). لذلك تعد البكتيريا السالبة لصبغة كرام الأكثر تأثراً وذلك للتأثير المباشر للقلويات على الغلاف الخارجي.

المصادر

- Jansen PCM. Spices, condiments and medical plants in Ethiopia: Their taxonomy and agricultural significance. Publisher: Center for

- 23.Seid, J. and Asrat, D. (2005). Occurance of extended spectrum B-lactamase enzyme from clinical isolates of Klebsiella species from Harar region, eastern Ethiopia. *Acta. Trop.*, 95: 143- 148.
24. نجيب، ليث مصلح ؛ سارة عماد هجول؛ وجдан أحمد علي ؛ سجي مصلح شويش. (٢٠١٢). دراسة باليوجية لتأثير مستخلص *E. coli* على الحبة السوداء تجاه بعض الصفات الخاصة بيكتيريا *Klebsiella*. *المحلية. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية*. (٢٥): ١٣ - ١٧.
25. العاني، يوسف رافع؛ ليث مصلح نجيب؛ عبد الوهاب بدبو حسین؛ هديل محمد فياض؛ عاصف حسن عبد الرزاق ؛ أيوب إبراهيم علي. (٢٠١١). دراسة بعض المتغيرات الناتجة عن تتفیق الأرانب المحلية بيكتيريا *Klebsiella* المضيفة. *مجلة الأنبار للعلوم البيطرية*. ٤ (٢): ٩٠ - ٩٥.
- 26.Baqir, A. W.; Alani, A. H. and Alkaisey, M. T. (2000). Inhibitory action of Iraqi Nigella sativa L. seeds (black cumin) extracts against some pathogenic microorganism. *Iraqi J. Microbial.*, 12 (1): 20- 28.
27. نجيب، ليث مصلح. (٢٠٠٧). دراسة إنتاج وتنقیة البكتريوسينات من بكتيريا حامض البنیک وتحديد بعض خواصه. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم- جامعة الأنبار.
- 28.Hanafi, M. S. and Hatem, M. E. (1991). Students on the antimicrobial activity of Nigella sativa seeds (black cumin). *J. Ethnopharmacol.*, 34 (2): 275- 278.
- 30.Morsin, N. M. (2000). Antimicrobial effect of crude extracts of Nigella sativa on multiple antibiotics- resistant bacterial. *Acta Microbial.*, 49 (1): 63- 74.
29. با موسى، عبد الله عمر. (٢٠٠٥). الحبة السوداء. كلية الطب جامعة الملك فيصل- المملكة العربية السعودية.
- klebsiella species by use of amplified fragment length polymorphism. *Res. Microbiol.*, 155: 17- 23.
- 17.Haryani, Y.; Noorzaleha, A. S.; Fatimah, A. B. and Noorjahan, B. A. (2007). Incidence of Klebsiella pneumonia in street food sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, Plasmid profiling and RAPD-PCR analysis. *Food Cont.*, 18: 847- 853.
- 18.Kanki, M.; Yoda, T.; Tsukamoto, T. and Shibata, T. (2002). Klebsiella pneumonia produces no histamine: Raoultella planticola and Raoultella ornithinolytica strains are histamine producers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (7): 3462- 3466.
- 19.Mpuchane, S. F. and Gashe, B. A. (1996). Presence of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Enterobacter* species in dried bush okra (*corchorus olitorius*) and African spider herb (*cleome gynandtra*). *Food Cont.*, 7(3): 169- 172.
- 20.Cartes, G.; Borell, N.; Astorza, B. and Gomez, C. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharides and lipopolysaccharides O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumonia* in a murine model of bacterial pneumonia. *Infect. Immun.*, 70 (5): 2583- 2590.
- 21.Trautmann, M.; Ruhnake, M.; Rukawnia, T. and Whitfield, C. (1997). O-antigen seroepidemiology of *Klebsiella* clinical isolates and implication for immunoprophylaxis of *Klebsiella* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5: 550- 555.
- 22.Umebobiamwa, L. B. and Berkowitz, M. D. (2009). Klebsiella infection Klebsiella spp as nosocomial pathogens: epidemiology, Taxonomy, Typing methods, and pathogenicity factor. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11 (4): 589- 603.

Study the Effect of *Nagilla sativa* Extracts on the resistance of Clinical *Klebsiella* isolates To antibiotics

Wejdan Ahmed Ali

E.mail: dean_coll.science@yahoo.com

Abstract:

Research includes the study effect extract of *Nagilla sativa* , aqueous and alcohol in inhibition the growth of local isolates belong to the genus *Klebsiella* , which isolated from different pathogenic states by interacting with some antibiotics (Vancomycin (VA) , Erythromycin (E) , Gentamycin (GN) , NitroFurantion (F) , chloramphenicol (c) , Also studied the effect of different concentration from aqueous extract for *Nagilla sativa* in special culture media of *Klebsiella pneumonia* of the local number (1) and reflection that on the sensitivity of its growth toward ten types of different antibiotics . Disc diffusion methods was used to study the activity inhibition of aqueous and alcohol extracts with antibiotics. The results showed aqueous extract or alcohol significant difference in activity from some antibiotics special antibiotic (VA) , that increase activity of local isolate number (1) from 0-19 , 19.5 mm for aqueous and alcohol extracts respectively and the same from antibiotic (E) with increase activity from 0-10 ,15 mm , on the other hand , the result showed the concentration of aqueous extract *Nagilla sativa* in culture media for local isolate no.1. leads to increase of its sensitivity towards some antibiotics especially Amoxycycline .