دراسة في الزجاج (خارج الخلية) لتأثير المستخلصات المائية للحلبة والحبة السوداء والقرنفل على نمو بكتريا *Nocardia asteroides*

رمزية حسن عبد الرحمن

شعبة الأحياء الطبية ، فرع التشريح ، كلية طب الموصل ، جامعة الموصل ، جمهورية العراق.

(تاريخ الاستلام: ٣ / ٦ / ٢٠٠٩ ، تاريخ القبول: ٢٥ / ١٠ / ٢٠٠٩)

الملخص

أظهرت المستخلصات المائية لنباتات الحلبة والحبة السوداء والقرنفل تأثيرا تثبيطيا على نمو بكتريا ***Nocardia asteroides*** وظهرت فروقات معنوية بين معاملة المقارنة وبقية المعاملات وكذلك بين المعاملات المختلفة ، وكان المستخلص المائي للحبة السوداء وبالتراكيز الثلاثة (25 ,12.5,6.25) % أكثرا تأثيرا على نمو البكتريا من المستخلص المائي للحلبة والذي كان مثبطا لنمو البكتريا عند التركيزين (25 ,12.5) % ، بينما كان تأثير المستخلص المائي للقرنفل مثبطا لنمو البكتريا وعند التركيز (25) % فقط .

الكلمات الدالة : *Nocardia asteroides* ، الأعشاب الطبية ، التداوي بالأعشاب ، المستخلصات النباتية .

المقدمة:

يضم جنس **Nocardia** جراثيم هوائية غير متحركة خيطية طويلة متفرعة يطلق عليها بالهايفات موجبة لصبغة كرام اغلبها تقاوم صبغة الكاربول فوكسين المحورة (طريقة كينون المحورة) بسبب احتواء جدران خلاياها على المادة الشمعية المسماة بحامض المايكوليك وهذه الجراثيم واسعة الانتشار في الطبيعة وتعيش بشكل رمي في التربة [1]، وتوجد في الطين والغبار والنباتات المتفسخة ولا توجد عادة الأنواع التابعة لها جزءا من النبيت الطبيعي في أي منطقة من مناطق الجسم حيث أن الأنواع التابعة لها تعد ممرضات انتهازية وتؤدي أحيانا إلى حدوث اخماج مميتة ناتجة عن الإصابة بداء النوكارديا في الإنسان والحيوان ، [2].

تسبب بكتريا***Nocardia asteroides*** العديد من الأمراض السريرية في الإنسان ومنها داء النوكارديا الرئوي وداء النوكارديا العصبي الجهازي المركزي وداء النوكارديا الجلدي كما تسبب إصابات العين [4,3].

ونظرا لشيوع تداول النباتات الطبية في العراق في مجال الطب الشعبي فقد تم اختيار بعض النباتات الطبية اعتمادا على كونها من النماذج المستخدم قديما وحديثا ولكون استخدامها لا يصاحبه أي أثار جانبية ، ولكونها شائعة الاستخدام محليا ورخيصة الثمن ولسهولة زراعتها وأنبتها محليا والحصول عليها ،[5] . ومن هذه النباتات المستخدمة هي :

الحلبة *Trigonella Foenum graecum*

إذ تعد الحلبة وهي من العائلة البقلية Leguminosae من النباتات الطبية القديمة جدا وهي عشبة حولية يصل ارتفاعها إلى (٨٠) سم وهي غزيرة التفريع القاعدي المنبسط والقائم والأوراق مركبة صغيرة جدا وتخرج في صورة عنقودية ذات ألوان مختلفة والثمار إما طويلة أو على هيئة قرون صغيرة أو كروية محتوية بداخلها على بذور صغيرة الحجم لونها بني مصفر والجزء المستخدم منها هي البذور ، حيث تكون هذه البذور مادة هلامية وصمغية تستخدم مساعد في المستخلصات الصيدلانية ، لوحظ بان المادة الهلامية للحلبة ذات قابلية انتفاخ كبيرة كما تحتوي على زيوت عطرية .

الاستخدامات الطبية للحلبة:- وجد بان لها القابلية على خفض السكر بالدم وبعض التقارير تشير إلى ربط الحلبة مع الأنسولين لغرض علاج المرضى المصابين بداء السكري والمادة الهلامية الموجودة في الحلبة تستخدم خارجيا مرطبا للبشرة وكمادات للخراجات والدمامل وغيرها ، داخليا تستخدم في حالات إصابة المعدة والأمعاء وتستخدم الحلبة في حالة فقر الدم الشديد وفي حالات الضعف والوهن بعد شفاء المريض من الأمراض الخطرة ، وأخيرا تستخدم في حالة النقرس والوهن العصبي، [6].

إما الحبة السوداء *Nigella Sativa* فهي من العائلة الشقيقية Ranunculaceae والاسم الإنكليزيNigella

وتسمى بالـ Black cumin والاسم المحلي حبة سوداء حبة البركة ، كمون اسود ، كمون الكحل وموطنه الأصلي منتشر في مدن البحر الأبيض المتوسط وتزرع في الباكستان والهند وهي قوية النمو ويصل ارتفاعه إلى (٦٠)سم وغزيرة التفريع، عليها اوبارا خفيفة، الأوراق مقسمة إلى أجزاء صغيرة خيطية الشكل والأزهار بيضاء الجزء المستخدم منها هي البذور والمكونات الأساسية الموجودة فيها هي :

1-Nigellone , Nigellicine , Palmitic acid
2-Myristic acid
3-Stearic acid
4-Linolenic acid
5-Semicarbazone
6-P-nitro azobenzene
7-2,4-dintrophenyl-hydrozone (as anit asthmatic)
8-Methyl-4-iso prophyl-p-quinone
9-Sponin , Abumen ,Metabin , Melanthin
10-Thymohidro quinons (anti bacterial), [7]..

ومن الاستخدامات الطبية للحبة السوداء خارجيا تستخدم كمطهر Anti septic ، الكلايكوسايد الموجودة فيها تعتبر كمضاد للتشنج Anti spasmodic ، مركب Negillone يعمل مضاد للهستامين المتحفز في حالة نوبة الشعيبات القصبية وتستخدم مدررا وطاردا للغازات ، ولكون الحبة السوداء ذات سمية قليلة فإنها تفيد كدواء في حالات المصابين باعتلال الكبد ، النقرس ، داء المفاصل[5] ، كما إن الحبة السوداء لها صفات مضادة للربو ومستخلص الحبة السوداء يثبط عددا كبيرا من البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، وبعض التقارير تشير إلى إن مستخلص الحبة السوداء له فعالية ضد البكتريا الآتية :

Bacillus cereus, Bacillus pupillus, Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus, Escherishia coli, Salmonella typhi, Shigella niger, Vibrio cholera [9,8]..

أما القرنفل (*Eugenia Caryophyllus*) *Clove* وهو من عائلة Caryophyllaceae والذي تستخدم منه البراعم الزهرية المجففة فانه يحوي زيت طيار تصل نسبته من (14-21) % وهو يحوي (84-95) % فينولات (يوجينول ، 3% استيل يوجينول) ، كاريوفيلين (الفا وبيتا)، تربينات ، استرات ، كيتونات ، كحولات ، وسيكواتيربينات والتي تعتبر مضادة للسرطان ويستخدم الزيت الطيار كعامل نكهة وله استخدامات عطرية مطهرة ، الأزهار مقوية للقلب ، معرقة ، ترياق ،العشبة طاردة للديدان ، [10].

المواد وطرائق العمل:

أولا إعداد النباتات الطبية لغرض الاستخلاص :

تم الحصول على النباتات الطبية المستخدمة في الدراسة من الأسواق المحلية وهي الحلبة والحبة السوداء والقرنفل ، وتم تصنيف النباتات المستخدمة تصنيفا أوليا في المختبر وتم التأكد منها في مختبرات كلية التربية / جامعة الموصل ، تم تنظيفها وغربلتها من الشوائب والأتربة ثم جففت طبيعيا بنشرها على أوراق جرائد وبطبقة خفيفة جدا مع التقليب المستمر منعا لحدوث التعفن وبعد إتمام عملية التجفيف تم تعبئتها في أكياس بلاستك لغرض خزنها لحين استخدامها لتحضير المستخلصات .

ثانيا تحضير المستخلصات:

تم تحضير المستخلصات المائية من أجزاء النباتات الطبية المستخدمة وذلك بسحق (50)غم من كل نبات ثم أضيف إلى كل منها (150) سم^3 ماء مقطر معقم ،ثم استكمل الهرس بواسطة الخلاط الكهربائي نوع (Ultra-Turax blender Germany) وتحت التبريد ، تركت العينات لمدة (24) ساعة مع التحريك بين فترة وأخرى ثم رشحت بواسطة طبقتين من الشاش واستكمل ترشيحها باستخدام قمع بخنر وباستخدام ورق ترشيح رقم (2) تحت التفريغ باستخدام مضخة تفريغ (Vacuum pump) وتم تعقيم المستخلصات المائية بتمريرها عبر مرشحات غشائية (Membrane filters) ذات قطر (0.22) مايكروميتر نوع (Whatman ,U.K.) لمنع مرور البكتريا من خلالها وجفف المستخلص باستخدام جهاز التجفيف (lyophilizer) وحفظ لحين الاستخدام [11].

ثالثا: تحضير البكتريا المختبرة:

تم تحضير مزارع بكتيرية حديثة بعمر أسبوع لبكتريا ***Nocardia asteroides*** التي تم عزلها من التربة وتم التأكد منها عن طريق ملاحظة الصفات المزرعية للمستعمرات وإجراء الاختبارات التشخيصية الاساسية و الكيموحيوية ومن ثم صبغها بصبغة كرام وصبغة كينون المحورة [12] .

رابعا :- تأثير المستخلصات المائية على نمو بكتريا *Nocardia asteroides* المختبرة:

تم اختبار تأثير المستخلصات المائية (الحلبة والحبة السوداء والقرنفل) على نمو بكتريا ***Nocardia asteroides*** ، وذلك بإضافة (حجم واحد ، حجمين ، وثلاثة أحجام) متساوية من كل مستخلص كلا على حدا إلى (45) سم^3 من وسط (Nutrant agar) المجهز من شركة (Oxoid)والمحضر حسب تعليمات الشركة المصنعة المعقم قبل تصلبه في دورق سعة (125) سم^3 تحت ظروف معقمة للحصول على التراكيز (25 , 12.5 , 6.25)% على التوالي [13] ، ثم رج الدورق وصب في أطباق بترية معقمة وبمعدل(10) سم^3 لكل طبق ، تم تحضير معلق بكتريا حديثة بتركيز (1×10^7) خلية بكتيرية حية / سم^3 المحسوبة بطريقة العد الحي بالأطباق ،تم تلقيح سطح الوسط الزرعي بعد تصلبه بطريقة التخطيط بالأطباق وبمعدل (3) مكررات لكل مستخلص مائي ولكل تركيز ،حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) م° لمدة أسبوع وبعد انتهاء فترة التحضين تم حساب أعداد البكتريا الحية في كل طبق [14].

عينة السيطرة الموجبة ، الوسط الزرعي +البكتريا

عينة السيطرة السالبة ، الوسط الزرعي + المستخلص

النتائج والمناقشة:

إن الدراسة الحالية أخذت بنظر الاعتبار ولأول مرة التأثير الحيوي التثبيطي لبعض النباتات الطبية الشائعة في العراق ضد بكتريا ***Nocardia asteroides*** بدراسات خارج خلوية *In vitro* .

تحتوي النباتات على المركبات الكيمياوية مثل الكاربوهيدرات والبروتينات والدهون التي تستخدم كغذاء للإنسان والحيوان وهذه المواد تسمى Primary Metabolites كما تحتوي مواد أخرى مثل (Terpenes , Glycosides , Alkaloids) وغيرها والتي تسمى Secondary Metabolites ، كما تحتوي النباتات على مواد خاملة والتي ليس لها فائدة طبية مثل السليلوز واللكنين والالبومين والنشا والمواد الصبغية وتحوي على مكونات فعالة ذات أهمية في التحضيرات الطبية وهي التي تؤدي إلى الترسيب والتغيرات الكيمياوية ومسؤولة عن الفعالية العلاجية للدواء [15].

تبين من نتائج الدراسة أن المستخلصات المائية لجميع النباتات المستخدمة في الدراسة وهي الحلبة والحبة السوداء والقرنفل كانت ذات تأثير مثبط على نمو أفراد النوع***Nocardia asteroides*** المختبرة وبنسب متفاوتة وكانت هناك فروقات معنوية بين معاملة المقارنة وبين بقية المعاملات وكذلك بين مختلف المعاملات وتبين من دراسة تأثير المستخلصات المائية لهذه النباتات الطبية إن مستخلص الحبة السوداء وبالتراكيز (6.25,12.5, 25) % كان أكفا المستخلصات في تأثيره على البكتريا حيث ثبط نمو البكتريا بصورة كلية عند التراكيز الثلاثة بعد أسبوع من التحضين مقارنة بعينة السيطرة، وقد تعزى الفعالية التثبيطية إلى احتواء بذور الحبة السوداء على مادة فعالة حساسة بدرجة حرارة أكثر من (100) م° أو اقل من(10) م°وتحتفظ بفعاليتها عند درجة حرارة البسترة وهذا ما يشجع على التعامل مع هذه البذور دون الحذر من فقدان الفعالية التثبيطية ولمدة لأتقل عن(20) يوما وهذا ما يفسر استخدامها في الطب الشعبي منثورا على أقراص الخبز [16].

كما تشير الدراسات إلى إن بذور حبة السوداء تحتوي على العديد من المركبات الكيمياوية ومن أهمها (Thymohidro guinous) حيث تشير بعض التقارير إلى إن لهذه المادة فعالية ضد البكتريا بصورة عامة وقد تعود أيضا هذه الفعالية التثبيطية إلى مركب (-2,4-dintrophenyl hydrozone) الذي يستخدم صيدلانيا كمضادا للربو وهناك تقارير تشير إلى إن المستخلص المائي للحبة السوداء له فعالية ضد العديد من أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وذلك باحتوائها على مواد تؤثر على بناء البروتين أو الأحماض النووية (DNA ,RNA) أو تؤثر على درجة الحامضية للوسط الخاص لنمو البكتريا بتفاعل مواد مستخلص الحبة

السوداء مع المواد الموجودة في الوسط وبالتالي تؤثر على أيونية وازموزية الوسط [17,7].

يليه في ذلك مستخلص الحلبة حيث ثبط نمو البكتريا عند التركيزين (25 ,12.5) % مقارنة بعينة السيطرة وقد يعود السبب في ذلك غلى عوامل عديدة منها طبيعة المركبات الكيمياوية الفعالة الموجودة في نبات الحلبة إذ إن من المحتمل أن تتغير بتغير طبيعة الوسط من حيث ثبوتية هذه المركبات الكيمياوية الموجودة في مستخلص الحلبة المائي الخام مع المركبات المكونة للوسط وقد تعود الفعالية التثبيطية إلى احتواء نبات الحلبة على زيوت عطرية وعلى بعض المركبات الكيمياوية وأهمها القلويدات (Trigonellin alkaloid) حيث تشير بعض التقارير إلى إن لهذه المادة فعالية ضد البكتريا [7] .

أما فيما يخص مستخلص القرنفل فقد ثبط نمو البكتريا بصورة كلية عند التركيز (25) % مقارنة بعينة السيطرة، كما مبين في الجدول (1) ، فقد يعود سبب تأثيره لاحتوائه على زيوت طيارة وزيوت عطرية وعل فينولات[18]، وكيتونات وكحولات واسترات وبعض المركبات والتي تعتبر مضادا لنمو البكتريا [15].

جدول رقم (1) التأثير التثبيطي لمستخلصات الحلبة والحبة السوداء والقرنفل على نمو بكتريا *Nocardia asteroides* .

نوع المستخلص	النسبة المئوية للتركيز %	(متوسط أعداد البكتريا) $\times 10^7$	عينة السيطرة الموجبة 1×10^7	عينة السيطرة السالبة
الحبة السوداء*	6.25	23	197	0
	12.5	9	185	
	25	3	178	
الحلبة*	6.25	92	188	0
	12.5	20	187	
	25	5	185	
القرنفل*	6.25	95	191	0
	12.5	92	190	
	25	9	189	

*تعني وجود فروقات معنوية بين المعاملة ومعاملة السيطرة عند مستوى احتمال 0.05.

المصادر

1. M. S. Sridhar, S. Sharma, P. Grag , and G.N. Rao. Treatment and outcome of Nocardia keretitis. Cornea, 20(2001)5: 458-462.

2. V. A. Orchard . The ecology of Nocardia and related to xazentral. Bakt. Supp; (1981) 11 : 167-180.

3. O.U. Osoagbaka. A brief review of the disease-Pulmonary nocardiosis with emphasis on the Nigerian environment Orient . J. Med (1996)8 : 1-10 .

4. G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin. Mandell, Douglas, and Benntts´Principles and Practice of infection diseases 5th ed., Churchill livingstone , U.S.A. (2000).

5 . عاشور ، عبد اللطيف ، التدواي بالأعشاب والنباتات الطبية مكتبة القران للطبع والنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر (1985) .

6 . سعد الدين ، شروق محمد كاظم ، الأعشاب الطبية ، مترجم .دار الشؤون الثقافية ، وزارة الثقافة والأعلام (1986).

7 . مجيد، سامي هاشم ومهند جميل محمود. النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي مجلس البحث العلمي بغداد (1988).

8. World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants (1999)1 : Geneva. 289.

9 . المنظمة العربية للتنمية الزراعية "النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي " جامعة الدول العربية ، الخرطوم (1988) .

10. W.Ch. Evans. Pharmacognosy. 14th ed. W. B. Saunders Co, London (1997). 612.

11. J. L. Roise , M. C. Racio , and A. J. Villar. Antimicrobial activity of selected plants employ in the Spanish Mediterranean area. Ethnopharma. J. (1987)21: 134-152.

12. G. Jello, J. Brown , E. Mahgoub ,and L. Ajello . A note on isolation of pathogenic aerobic actinomycetes from Sudanese soils. Curr. Microbiol. (1979)2 : 25-26.

13. محمد ، صالح عيسى وعبد الهادي ، شمال يونس ، تأثير مستخلصات البابونج والدارسين والقرنفل على بعض الفطريات المرضية . مجلة علوم الرافدين ، (2001) المجلد 12 العدد 1 ص 19- 25 .

14. J. Esteban , J. Ramos , M. L. Fernadez – Cuerrero , and F. Soriane .Isolation of Nocardia sp. From blood culture in a teaching hospital . Scand . J. Infect. Dis. (1994)26 : 693 - 696 .

15 . السلطان، صبا عبد السلام، التأثير التثبيطي لبعض المستخلصات النباتية على نمو بكتريا حمى مالطة ، رسالة ماجستير ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل (1993) .

16 . عبد الخالق ، عبد الغني ، الطب النبوي ، دار العلوم الحديثة ، بيروت – لبنان ، الطبعة الثانية (1985) .

17. T. E. Wallis . Text book of Pharmaco. (1967) . 5th ed . J. and A Churchill Ltd . London . 652 .

18 . أيوب ، إقبال ، التجميل بالأعشاب ، مترجم ، دار الشؤون الثقافية العامة ، الطبعة الأولى ، بغداد (1989) .

In vitro study of the effect of aqueous extracts of *Trigonella Foenum graecum*, *Nigella Sativa* and *Clove* (*Eugenia Caryophyllus*) on the growth of *Nocardia asteroides*.

Ramzia Hassan Abdul Rahman

Class of Medical Biology, Anatomy Department , College of Medicine , University of Mosul , Mosul , Iraq

(Received 3 / 6 / 2009 , Accepted 25 / 10 / 2009)

Abstract:

All aqueous extract for *Trigonella Foenum graecum, Nigella Sativa* and *Clove* (*Eugenia Caryophyllus*) showed inhibitory effects against growth of ***Nocardia asteroides*** bacteria in contrast with the control samples. The *Nigella Sativa* extract processed inhibitory effect for the bacteria in all concentrations (6.25,12.5, 25) % compared with *Trigonella Foenum graecum* extract which showed inhibitory effect with both concentration (12.5,25)% while the inhibitory effect of the *Clove*(*Eugenia Caryophyllus*) extract for the growth of bacteria was exclusively only in the (25%) concentration.