تأثير المستخلص الزيتي لبذور الحبة السوداء *Nigella sativa* في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة للانسان

بسام غازي الخطيب ابتسام قحطان عبد الكريم عادل عدنان علي
فرع الهندسة الوراثية- معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية-جامعة بغداد

الخلاصة

جمعت 50 عينة، شملت مسحات من أفواه اطفال مصابين بداء السلاق الفمي Oral thrush، تراوحت أعمارهم بين حديثي الولادة ولغاية 8 سنوات. لعزل الخميرة *Candida albicans* ، اضافة الى العينات التي أخذت من التربة لعزل بعض الفطريات المرضية الفرصية *Apportunistic fungi* التي تعيش مترممة Saprophytes في التربة ومنها *Aspergillus fumigatus* ، *Fusarium* spp. ، *Penicillium* spp. والفطر *Alternaria* spp. .

استخلص زيت الحبة السوداء بطريقة التقطير المائي باستخدام جهاز كلافنجر Glavenger apparatus. ولغرض دراسة تأثير المستخلص الزيتي للحبة السوداء في تثبيط نمو الفطريات، استخدمت طريقة الانتشار بالحفر Agar well diffusion method .

وكانت أعلى نسبة تثبيط عند التركيز 50% ، اذ بلغت 43.33% ، 51.00% ، 49.66% و 47.66% للخميرة *Candida albicans* والفطريات *Aspergillus fumigatus* ، *Penicillium* sp. و *Alternaria* sp. ، على الترتيب، بينما الفطر *Fusarium* sp. فكان مقاوماً لجميع التراكيز ما عدا التركيز 100% اذ كانت نسبة التثبيط 14.00%.

ABSTRACT

A total of 50 sample were collected , swabs from children mouthes who infected with oral thrush, their age ranged between new born to 8 years old, to isolate the yeast *Candida albicans*, in addition to the samples taken from soil, to isolate the apportunistic fungi were caused human diseases, the fungi were *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Alternaria* spp.

Oil of *Nigella saliva* was extracted by hydrodistillation method using Glavenger apparatus, to study the effect of oil extracted of *N. sativa* against the growth of fungi, agar well diffusion method was used.

The highest percentage of inhibition was at the concentration of 50% of oil extracted, were 43.33% , 51.00% , 49.66% and 47.66% for the yeast *Candida albicans*, and the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp. and *Alternaria* sp., respectively, whereas *Fusarium* sp. was resistant for all concentration except 100%, where the percentage of inhibition was 14.00%.

Keywords: ***Nigella sativa,*** **Fungi,** ***Candida albicans.***

المقدمة

استخدم الانسان ومنذ فترة ما قبل التاريخ، النباتات والأعشاب للأغراض الطبية واستعملها لمعالجة الأمراض التي يصاب بها، فضلاً عن استخدامها كمصدر غذائي (الراوي وجاكرة فارتي،1988). لقد أثبت العلم الحديث بان المملكة النباتية غنية بمنتجاتها الأيضية الثانوية المتميزة بنشاطها الحيوي بايولوجياً وتأثيرها الفسلجي علاجياً ضدالأمراض المستعصية التي تصيب الانسان والحيوان والطيوروغيرها من الكائنات الحية (ابو زيد،2002).

الحبة السوداء نبات عشبي صغير يصل ارتفاعه لأكثر من 45 سم ويعود الى العائلة Ranunculaceae والآن يزرع في جميع أرجاء المناطق الاستوائية من العالم (Chakravarty,1979).

يحتوي زيت الحبة السوداء على العديد من المركبات الفعالة مثل Nigellone وهو بوليمر من Thymoquinone و Glutathione اللذان يعتبران مضادات أكسدة طبيعية تستخدم لحماية الانسجة من مخاطر البيروكسيدات Peroxides والجذور الحرة Free radicals ومن بعض المواد الغريبة في الجسم Xenobiotics .أما مركب Thymoquinone

ISSN 2072-3875

ومشتقاته thymohydroquinon و dithymoquinone فتعد مضادات لأنواع متعددة من الجراثيم والفطريات fungi (Haq,1999). وتعتبر مادة Nigellidine و Nigellimine و Saponine مضادات للحساسية والربو القصبي Bronchial asthma (Mc Dougald,1990). اما الستيرولات Sterols بأنواعها فتعتبر مضادات للنشاط السرطاني Anti-carcinogenic (Cindy,2001).

وتتميز الحبة السوداء وزيتها بخواص طبية عديدة مفيدة، فهي محفزة لجهاز المناعة، منعشة، عطرية، مساعدة للهضم، مدررة للبول والحليب، فاتحة للشهية، مقوية ومنشطة، طاردة للديدان، وغيرها من الخواص النافعة (Michael Tierra , 2003 ; Conant et al. ,1971) أجريت هذه الدراسة لغرض معرفة تأثير المستخلص الزيتي الخام لبذور الحبة السوداء في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة للانسان مختبرياً

المواد وطرائق العمل

شملت هذه الدراسة 50 عينة، أخذ 10 منها كمسحات swabs من أفواه أطفال مصابين بداء السلاق الفمي oral thrush أخذت من المراجعين للعيادة الاستشارية لمستشفى الطفل المركزي في محافظة بغداد، تراوحت أعمارهم بين حديثي الولادة ولغاية 8 سنوات، خلال الفترة من بداية شهر آذار حتى أواخره 2008، لعزل الخميرة *Candida albicans* . كما أخذت 5 مسحات فمية من أطفال سليمين كمجموعة سيطرة، زرعت المسحات بعد نقلها الى المختبر مباشرة على أوساط زرعية صلبة Sabouraud's Glucose Agar (SGA) لتنمية الخميرة المعزولة واستخدمت طريقة التخطيط Streaking لضمان الحصول على مستعمرات نقية، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة. فضلاً عن العينات التي أخذت من ترب مختلفة لعزل الفطريات المترممة وهي *Aspergillus. fumigatus* و.spp *Fusarium* و spp. *Penicillium* و *Alternaria* spp. تم عزل الفطريات قيد الدراسة من التربة باستخدام طريقة نثر التربة في الاطباق Soil sprinkling method و جمعت عينات تربة من مناطق واعماق مختلفة (0-30)سم ووضعت في اكياس البولي اثيلين وجلبت الى المختبر وتم اخذ 100 غم من كل عينة وخلطت في كيس واحد من البولي اثيلين لحين الاستعمال. تم تحضير وسط الاكار المائي water agar الضعيف والخالي من الاضافات الغذائية و المجهز بالمضاد الحيوي كلورومفنيكول(50 ملغم/لتر).نثر(0.5-1)غم من عينة التربة على الاطباق الحاوية على الاكار المائي و حضنت بدرجة حرارة (25±1)م°. بعد 72 ساعة فحصت الاطباق تحت المجهر باستخدام القوة الصغرى لملاحظة الفطريات النامية وفي هذا الطريقة يمكن الحصول على العديد من الانواع الفطرية الموجودة في التربة والتي تنمو بشكل مستعمرات منفصلة عن بعضها البعض،ولغرض عزل الانواع الفطرية المطلوبة في هذه الدراسة ، تم التقاط الكونيدات الفطرية التي تعلو عن سطح الطبق بمسافة تسمح بالتقاطها باستعمال ابرة دقيقة معقمة وبدقة عالية ونقلت الكونيدات الى اطباق حاوية على وسط غذائي غني وقد استعمل وسط Potato dextrose agar (PDA) لغرض الحصولعلى المزارع النقية للانواع الفطرية المختلفة .

تشخيص الأنواع الفطرية

بعد ظهور المستعمرات على وسط (SGA) شخصت المستعمرات الفطرية أعتماداً على المظهر الخارجي (لون وشكل المستعمرات) وكذلك شكل الكونيدات والخيوط الفطرية والحوامل الكونيدية (Conant et al.,1971). كما تم تشخيص الخميرة *Candida albicans* بالاعتماد على ما جاء في Buckley وأجريت الاختبارات الكيموحيوية وفقاً للطرائق الخاصة بهذه الاختبارات (Konemon et al.,1979 ; Collee et al.,1996 ; Odd,1979; Buckley , 1989)

استخلاص الزيت

استخدمت في هذه الدراسة بذور الحبة السوداء *Nigella sativa* التي تم الحصول عليهامن الاسواق المحلية في مدينة بغداد، وحفظت في قناني زجاجية لحين الاستعمال.

ولغرض استخلاص زيت بذور الحبة السوداء، استخدمت طريقة Goren (Goren et al.,2002) وطريقة Bankole و Joda (Bankole&Joda,2004) وهي التقطير المائي Hydrodistillation باستخدام جهاز التقطير Glaverger.

اختبار فعالية الزيت في تثبيط النمو الفطري

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر Agar well diffusion method (Rahman&Gul,2002;Bonjar,2004) وكالآتي:

ISSN 2072-3875

1. حضرت عوالق من كل من الأنواع الفطرية المستخدمة في هذه الدراسة بتركيز 1.5×10^8 خلية حية /مليلتر بأتباع طريقة Atlas (Atlas et al.,1995) وذلك بنقل جزء من المستعمرة الفطرية النامية على وسط (SGA) الى أنبوب اختبار حاوي على 10 مل Nutrient Broth المعقم، وحضن مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 25-30°م. بعدها أجريت سلسلة من التخافيف وكانت الكثافة الضوئية 0.5 نانومتر لكل تخفيف باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 540 نانومتر واخذ 100 مايكروليتر من كل تخفيف وزرع على وسط (SGA) باسخدام ناشر زجاجي معقم Spreader وحضنت الأطباق مدة 24 ساعة ثم حسب عدد الخلايا.

-1 حضرت التراكيز (0.7، 1، 3.1، 6.3، 12.5، 25، 50، 100)% لزيت بذور الحبة السوداء وذلك بإذابة (7، 10، 30، 60، 125، 250، 500، 0) مايكرولتر من الزيت بالمذيب العضوي Dimehtyl Sulphoxide (DMSO) لتكملة الحجم الى 1 مل.

-2 نشر 200 مايكرولتر من عالق الفطريات على وسط (SGA) باستخدام الناشر الزجاجي spreader بجميع الاتجاهات وبشكل متساوي، ثم تركت الاطباق لتجف.

-3 عملت حفر بقطر 8 ملم في مركز الاطباق الحاوية على الوسط الزرعي الملقح بجراثيم الفطريات (حفرة واحدة لكل طبق) باستخدام ثاقب فليني معقم.

-4 أضيف 100 مايكرولتر من كل من التراكيز المحضرة سابقاً في كل حفرة، إضافة الى معاملة السيطرة (DMSO)، وتم استخدام ثلاثة مكررات لكل تركيز.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج هذه الدراسة (جدول 1 ،2) وجود تأثير مثبط لجميع تراكيز المستخلص الزيتي لبذور الحبة السوداء ضد أنواع الفطريات قيد الدراسة باستثناء الفطر .*Fusarium* spp والذي قاوم جميع التراكيز ما عدا تركيز 100%، إذ لوحظ وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $p<0.05$ بين التراكيز المختلفة ومعاملة السيطرة. أظهر زيت بذور الحبة السوداء تثبيطاً واضحاً للخميرة *Candida albicans* عند التركيز 0.7% ، إذ بلغ قطر هالة التثبيط 5.85 ملم وبنسبة تثبيط 7.66% ، وأستمرت الزيادة في التثبيط بزيادة تركيز الزيت حتى بلغت أعلى نسبة تثبيط 43.33% وبلغ قطر هالة التثبيط 35.66 ملم، عند التركيز 50% ، ثم أنخفضت معدلات أقطار هالات التثبيط عند التركيز 100% إذ بلغ قطر هالة التثبيط 8.66 ملم وبنسبة تثبيط 10.66%.أما بالنسبة للفطر *Aspergillus fumigatus* فقد سبب التركيز 0.7% هالة تثبيط بقطر 16.67 ملم وبنسبة تثبيط 18.66%. وازدادت أقطار هالات التثبيط ونسب التثبيط بزيادة تركيز الزيت ووصل أعلى قطر 42.67 ملم وبنسبة تثبيط 51.00% ، عند التركيز 50% جدول (1).

وفيما يخص الفطر .*Fusarium* spp ، فلم يتأثر بجميع تراكيز الزيت ما عدا تركيز 100% إذ بلغ معدل قطر هالة التثبيط 12.00 ملم وبنسبة تثبيط 14.00%.

وتأثر الفطر .*Penicillium* spp بزيت بذور الحبة السوداء فبلغ معدل قطر هالة التثبيط 13.50 ملم وبنسبة تثبيط 15.33 % عند التركيز 0.7% . وأستمرت الزيادة في نسب التثبيط حتى بلغت 49.66% وبقطر هالة تثبيط 41.33 عند التركيز 50%.

كذلك تأثر الفطر .*Alternaria* spp بالزيت فبلغ معدل قطر هالة التثبيط 9.83 ملم وبنسبة تثبيط 12.00% عند التركيز 0.7% وأزدادت أقطار هالات التثبيط ونسب التثبيط بزيادة تركيز الزيت حتى بلغ معدل قطر هالة التثبيط 40.00 ملم وبنسبة تثبيط 47.66 % عند التركيز 50%.

وقد أظهر التحليل الاحصائي (جدول 1 ،2) عدم وجود فروقات معنوية بين التراكيز (50% ، 25% ، 12.5%) بالنسبة لتأثير الزيت علىالانواع الفطرية المستخدمة في هذه الدراسة ما عداالفطر .*Fusarium* spp عند مستوى معنوية $P<0.05$. أما بقية التراكيز فقد أظهرت فروقات معنوية في تأثيرها على الأنواع المختلفة من الفطريات، كما ان جميع التراكيز (ما عدا الفطر .*Fusarium* spp) قد أظهرت فروقات معنوية بين المعاملات وبين معاملة السيطرة control عند مستوى معنوية $P<0.05$ وأظهرت النتائج جدول (1، 2) بأن نسب التثبيط قد ازدادت مع زيادة تركيز المستخلص الزيتي لبذور الحبة السوداء، اي ان العلاقة طردية لحين الوصول الى تركيز 50%. وقد يعود سبب انخفاض نسب التثبيط عند التركيز 100% الى محدودية انتشار الزيت بسبب التركيز العالي له وعدم وصوله الى مناطق بعيدة عند مركز الأطباق، وليس بسبب عدم فعاليته عند التراكيز العالية.

وقد تعزى قابلية زيت بذور الحبة السوداء في تثبيط نمو الفطريات المختلفة الى احتواءه على نسب كبيرة من المركبات الكيمياوية والتي أهمها *Thymoquinone* و *thymohydroquinone* و *Dithymoquinone*. والتي تعمل على تثبيط الانزيمات المسؤولة عن التفاعلات الايضية مما يؤدي الى توقف نمو الفطريات وعدم استمرار حياتها (Haq,1999).

ISSN 2072-3875

جدول (1): تأثير المستخلص الزيتي *Nigella sativa* في أقطار تثبيط المستعمرات الفطرية (ملم)

التراكيز% / المستعمرات الفطرية	0.7	1	3.1	6.3	12.5	25	50	100	Control	LSD
Candida albicans	5.83	8.33	18.00	23.66	25.00	31.66	35.66	8.66	0.00	*2.028
Aspergillus fumigatus	16.67	18.33	22.67	25.67	35.33	39.67	42.67	18.33	0.00	*3.012
Fusarium spp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.00	0.00	*1.143
Penicillium spp.	13.50	15.33	19.66	24.33	32.66	36.66	41.33	12.00	0.00	*2.442
Alternaria spp.	9.83	12.33	18.66	25.33	31.33	35.00	40.00	11.66	0.00	*2.697
LSD	*1.251	*2.066	*1.912	*2.019	*0.887	*1.068	*2.075	*1.123	n.s 0.000	

*** = Significant at P<0.05**

n.s = non significant

جدول (2): تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص الزيتي للحبة السوداء *Nigella sativa* في نسبة تثبيط نمو المستعمرات الفطرية (%)

التراكيز% / المستعمرات الفطرية	0.7	1	3.1	6.3	12.5	25	50	100	Control	LSD
Candida albicans	7.66	10.33	22.33	28.66	30.00	38.66	43.33	10.66	0.00	*2.578
Aspergillus fumigatus	18.66	22.33	27.66	30.66	42.66	47.00	51.00	22.33	0.00	*2.425
Fusarium spp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.00	0.00	*1.143
Penicillium spp.	15.33	18.66	23.66	29.33	39.66	44.00	49.66	14.00	0.00	*3.131
Alternaria spp.	12.00	14.33	22.66	30.33	38.66	42.33	47.66	13.66	0.00	*3.350
LSD	*2.012	*1.334	*1.066	*2.365	*1.075	*0.564	*1.078	*2.059	n.s 0.000	

*** = Significant at P<0.05**

n.s = non significant

المصادر:

ابو زيد، الشحات نصر (2002) ، النباتات والاعشاب الطبية. الطبعة الثانية، الدار العربية للنشر والتوزيع،القاهرة.

Atlas, R.M.; Brown, A.E. and Parks, L.C. (1995). Laborotary Manual Experimental Microbiology. Mosby. St. Louis. London.

ISSN 2072-3875

Bankole, S.A. and Joda, A.O. (2004). Effect of lemon grass *Cymbopogon citratus* Stapf. Powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds *Colocynthis citrullusi* L. J. Biotechnol., 3(1): 52-59.

Bonjar, G.H.S. (2004). Antiyeast activity of some plants used in traditional herbal-medicine of Iran. J. Biol. Sci. 4(2): 212-215.

Buckley, H.R. (1989). Identification of yeasts. In: Medical Mycology. A practical approach. (eds by E.G.V. Evan and M.D. Richardson), IRL press. Oxford University. pp. 97-110.

Chakravarty, H.L. (1979). Plant wealth of Iraq. Ministry of Agriculture and Agrarian reform, Iraq, Sree Saraswaty Press. India. pp. 387-388.

Cindy, L.A. (2001). Herbal aids for cancer.

Collee. J.C.; Fraser, A.G.; Marmanin, B.P. and Simmons, A. (1996). Mackie and Mac Cartney, Practical Medical Microbiology. 14th ed. the churchill. Livingstone, New York.

Conant, N.F.; Smith, D.T.; Baker, R.D.; Callaway, J.L. (1971). Manual of Clinical Mycology. W.B. Saunders Company Press. USA pp. 677-697.

Goren, A.C.; Topcu, G.; Bilsel, G. and Bilsel, M. (2002). The chemical constituents and biological of essential oil of *Lavandula stoechas* spp.

Haq, A. (1999). Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int. J. Immunoph ar. 21:283-295.

Konemon, E.W.; Roberts, G.D. and Wright, S.E. (1979). Practical laboratory Mycology. 2nd ed. Williams and Wilkins Company. Baltimore.

Mc Dougald, L. R. (1990). Control of coccidiosis chemotherapy coccidiosis of man and domestic animals. Pp. 307-320. P.L. Ionged Boca Rotary, CRC press.

Michael Tierra, L.A.C. (2003). *Nigella sativa*, commonly Known as (Love in the mist) a beautiful Middle Eastern herb with many uses.

Odd, F.C. (1979). *Candida* and *Candiasis.* Leicester University. press. London. pp. 381.

Rahman, M.U. and Gul, S. (2002). Antibacterial activity of hydrodistilled essential oil of *Psammogeton canescens* N.O. Umbelliferae. Biotechnol. 1(1): 55-60.

ISSN 2072-3875