تأثير المستخلصات الخام لبذور الحبة السوداء *Nigella Sativa* في الأحياء المجهرية المعزولة من إصابات سريرية.

رياض عبد الجبار عبد الصاحب ، غازي منعم عزيز ، حواء محمد ناصر المُلا

قسم التقنيات الإحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد– العراق.

الخلاصة

حُضرت أنواع مختلفة من المستخلصات الخام لبذور الحبة السوداء شملت المستخلص الزيتي باستعمال الـ Soxhelt (**OS**) والمستخلص الزيتي باستعمال الـ Reflux (**OR**) والمستخلص الكحولي (**EE**) والمستخلص المائي (**AE**) والمستخلص بدارئ الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 7 (**BE**). دلت نتائج الكشف الكيميائي احتوائها على معظم المركبات الفعالة من القلويدات والتانينات والكلوكوسيدات والراتنجات والصابونيات والكومارينات والفلافونات .

دُرست فعالية المستخلصات ضد 50 عزلة (40 عزلة سريريه و7 عزلات من حالات تلوث بالمستشفيات و3 عزلات قياسية) باستعمال طريقتي الحفر وأقراص ورق الترشيح ،وتم تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) بطريقة الوسط الصلب. أظهرت النتائج إن أفضل المستخلصات المحضرة فعالية ضد الأحياء المجهرية هو مستخلص OR يليه مستخلص OS ثم EE و AE واقلها فعالية هو مستخلص BE وكانت أكثر الأحياء المجهرية حساسية للمستخلصات (بانخفاض قيم الـ MIC والـ MBC) هي البكتريا الموجبة لملون غرام (وأكثرها تحسساً هي *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cerreus* تلتها *Bacillus subtilis* و الـ *Staphylococcus epidermidis* واقلها حساسية الـ *Streptococcus fecales*) اما البكتريا السالبة لملون غرام كانت اقل حساسية من سابقتها (بكتريا الـ *Pseudomonas aeroginosa* الاكثر حساسية وتلتها *Escherichia coli* ولم تظهر بكتريا الـ *Klebsiella pneumoniae* والـ *Proteus mirabilis* والـ *Serratia marcesens* حساسية تجاه أي من المستخلصات) وأظهرت المستخلصات تأثيراً واضحاً ضد خميرة *Candida albicans* وبتأثير اقل تجاه العفن *Aspergillus niger* .

THE EFFECT OF *NIGELLA SATIVA* CRUD EXTRACTS ON MICROORGANISMS ISOLATED FROM CLINICAL INFECTIONS.

Abstract

Crud extracts of *N. sativa* seeds were prepared :Oil extract using soxhelt **(OS),** Oil extract using Reflux**(OR),**ethanol extract **(EE)**, aqueous extract **(AE)**and buffer extract **(BE)**.

The chemical tests indicated that *N. sativa* seeds have the active compounds include, alkaloids , tannins , glycosides, resins, saponins, coumorins and flavonoids .

The antimicrobial activity against 50 isolates (40 clinical isolates, 7 isolates from hospitals contamination and 3 standard strains)were studied by using disk diffusion and wells methods, the minimum inhibitory concentration **(MIC)** and the minimum bactericidal concentration **(MBC)** were determined by using agar dilution method . The results revealed that the most efficienty extracts were **OR** ,followed by **OS , EE, AE** and the less efficienty extracts was **BE.**

The most sensitive microorganisms to the extracts (decreased **MIC** and **MBC** values) were gram positive bacteria (*S. aureus, B. cereus, B. subtilis, S. epidermidis* and *S. fecales)* while gram negative bacteria appears less sensitive (*P. aeroginosa* was the most sensitive, followed by *E. coli* but *K. pneumoniae , P. mirabilis* and *S. marcesens* didn't show any response to all extracts), *C.albicans* revealed more sensitive than *A. niger* **.**

المقدمة

تعود الحبة السوداء *Nigella sativa* إلى العائلة الشقائقية Ranunculaceae وتعرف بأسماء عدة منها حبة البركة و الكمون الأسود والكراوية السوداء و القزحة و القحطة و الشونيز. وهي بذورلعشبة حولية تعلو 30 سم وتزرع في كثير من أنحاء آسيا ومنطقة البحر المتوسط. تحتوي البذور على 40% من الزيت الثابت Fixd oil وحوالي 1.4% من الزيت الطيار Volatile oil وبروتينات وقلويدات و صابونين (Saponin)[1].

أظهرت مستخلصات بذور الحبة السوداء فعالية دوائية(Pharmacolgical activity) في معالجة السرطان (Antitumer) [2 و 3 و4و5] واستعملت كخافضة للحرارة (Antipyretic) ومسكنة للآلام (Analgesic) ومضاد للالتهابات المفصلية (Anti-inflammatory) [6و7] وحماية ضد السمية الكلوية (Nephrotoxicity)[8] ومعالجة سمية الكبد (Hepatotoxicity) [9و10و 11] الناتجة عن المواد الكيميائية أو الإصابة بأحد الأمراض . ولها تأثير واقي وفعال ضد التأثير المخرش للمعدة (Antiulcer) الذي يحدثه الكحول [12و 13] كما إنها تقي من أمراض القلب والشرايين [14] وارتفاع دهون الدم والكولسترول والدهون الثلاثية (Antihyperlipidemic) [15] ولها تأثير مدر للبول (Diuretic) وخافض لضغط الدم [16] وسكر الدم (Antidiabetic) [17] و مضاد للأكسدة (Antioxidant)[18] و[19و20] التي تساعد في وقاية الجسم من تأثير الجذور الحرة التي تساهم في هدم العديد من الأنسجة . وأكدت نتائج إحدى الدراسات [21] تحسن الأعراض عند كل المرضى المصابين بالربو القصبي والتهاب الأنف ألتحسسي و الاكزيما التحسسية ، ولها تأثير مرخي لعضلات الرغامي والقصبات (Spasmolytic and Bronchodilator) وهذا يساعد في علاج الربو (Asthma) [22و23] .

بينت الدراسات الحديثة وجود فعالية قوية لبذور الحبة السوداء في إخماد مرض الملاريا وعلاجه والوقاية منه نظرا لاحتوائها على مواد فعالة يمكن استخلاصها لتمثل قفزة جديدة ضد مرض الملاريا (Anti-malarial). ولها تأثير يحفز الجهاز المناعي للسيطرة على طفيلي مرض النوم *Trypansoma brucei* [24و 25 و26]. ولبذور الحبة السوداء فعالية مطهرة ومضادة للديدان المعوية (Anti-cestodal) ولاسيما لدى الأطفال [27] فضلا عن تأثيرها المضاد للفطريات (Antifungal) [28] والبكتريا (Antibacterial) الموجبة والسالبة لصبغة غرام [29و30و31] .

وبالنظر لقلة الدراسات المحلية على بذور الحبة السوداء فقد هدفت الدراسة إلى :

- استخلاص المركبات الخام لبذور الحبة السوداء باستعمال طرائق مختلفة وتحديد الطريقة الأكفأ.
- الكشف عن وجود المركبات الفعالة في بذور الحبة السوداء .
- تحديد تأثير المستخلصات الخام على بعض البكتريا القياسية والمرضية السالبة والموجبة لملون غرام المعزولة من إصابات سريريه فضلا عن تأثيرها على الفطريات المرضية.

طرائق العمل

أولاً: الاستخلاص.

وزن 100غرام من بذور الحبة السوداء وأضيف إليها 600 مل أي بنسبة 6:1 (وزن: حجم) من الكحول الاثيلي 96% أو استعمال الماء المقطر أو دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 7 وتم الاستخلاص باستعمال جهازال Reflux لمدة 10 ساعات ، رشح المستخلص بورق ترشيح ووضع الراشح في جهاز المبخر الدوار(Rotary evaporater) [30] . تم التجفيف الكامل

بوضع المستخلص الناتج في أطباق زجاجية في فرن بدرجة 50°م لمدة 24 ساعة (لوحظ ظهور طبقتين بعد تجفيف المستخلص الكحولي طبقة من الزيت وأخرى جافة نقلت طبقة الزيت إلى قنينة زجاجية) وكشط المستخلص الجاف ووضع في قنينة زجاجية معلمة وحفظت بدرجة 4 °م لحين الاستعمال .

كما استعمل جهاز الاستخلاص المستمر Soxhelt) (apparatus وذلك بإضافة 600 مل من الكحول الاثيلي 96% إلى كشتبان (Thimble) حاوي على 100غرام من بذور الحبة السوداء ، وبعد انتهاء عملية الاستخلاص يبخر المذيب باستعمال جهاز المبخر الدوار تحت ضغط مخلخل ، حسب وزن الدهن الناتج وقدرت نسبته المئوية في البذور .

ثانياً:الكشف عن المركبات الفعالة الموجودة في بذور الحبة السوداء.

وشملت الكشف عن وجود القلويدات (Alkaloids)[32] والتانينات (Tannins) والكلايكوسيدات (Glycosides) والراتنجات (Resins) والصابونيات (Saponins)[33] و(الكومارين Coumarin)[34] تبعاً للطرائق الخاصة بها.

ثالثاً:جمع العينات وتشخيصها.

جمعت 40 عينة من المرضى المراجعين للمختبرات التعليمية في مستشفى بغداد التعليمي / مدينة الطب /باب المعظم وشخصت بالاعتماد على مصنف بركى [35] بأجراء الاختبارات الكيموحيوية واستعمال نظام api فضلا عن 7 عزلات معزولة من تلوث المستشفيات (*Bacillus cereus* والـ *Bacillus subtilis* والعفن *Aspergillus niger*) و 3 عزلات قياسية (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 والـ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 والـ *Escherichia coli* ATCC 25922)

رابعاً: اختبار فعالية المستخلصات ضد الأحياء المجهرية.

1- طريقة أقراص ورق الترشيح Disk diffusion) (method : هيأت أقراص ورق ترشيح وعقمت بجهاز المؤصدة ، حضرت المحاليل الخزينة (Stock solutions) بتركيز 128 ملغرام /مل لكل من المستخلص المائي والكحولي والدارئ أما الزيت فاذيب بمادة Dimethyl sulphoxide (DMSO)[24] وبتركيز 50%. حملت الأقراص بـ 20 مايكروليتر من كل مستخلص ووضعت على طبق وسط مولر هنتون الصلب مزروع باستعمال مسحة قطنية مغمورة بعالق جرثومي بتركيز 10^8 خلية مكونة لمستعمرة / مل ،وضعت الأطباق بحاضنة بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة للبكتريا وبدرجة 28 °م لمدة 48 ساعة للخميرة ولمدة 5 أيام للعفن . وتم قياس أقطار منطقة التثبيط .

2- طريقة الحفر (Wells method) : استعمل ثاقب الفلين (Cork barar) لعمل حفر في طبق مولر هنتون الصلب المزروع بالأحياء المجهرية قيد البحث ،ملئت الحفر بـ 40 مايكروليتر من كل مستخلص وحضنت بنفس الظروف السابقة .

خامساً: تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibition Concentration (MIC) والتركيز القاتل الأدنى Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

حضر وسط مولر هنتون الصلب وعقم بالموصدة بدرجة 121°م لمدة 15 دقيقة ،ثم برد الوسط لدرجة 50-45 °م وأضيف إليه كمية من المستخلصات ليكون التركيز النهائي المطلوب (0.25و 0.5 و 1 و2 و 4 و 8 و 16 و 32 و 64) % بالنسبة للزيت ومن 0.25 -128 ملغم / مل للمستخلصات الأخرى ومزجت جيداً وصبت في أطباق معقمة وتركت لتتصلب ثم زرعت بالأحياء المجهرية قيد الدراسة بأخذ 5 مايكروليتر من اللقاح بتركيز 10^5 خلية مكونة لمستعمرة / مل، حضنت الأطباق بنفس الظروف السابقة وتقرأ النتائج مقارنة بالسيطرة [36] (ثلاث مكررات لكل تجربة).حدد التركيز المثبط الأدنى كأقل تركيز من المستخلص يثبط النمو المرئي للأحياء المجهرية ، وحدد التركيز القاتل الأدنى كأقل تركيز من المستخلص يقتل الأحياء المجهرية.

النتائج والمناقشة

تحضير مستخلصات بذور الحبة السوداء.

أظهرت النتائج وجود اختلافات في القيم تبعاً لنوعية محلول الاستخلاص وطريقة الاستخلاص المستعملة إذ وجد أن أعلى نسبة مئوية لهذه المستخلصات كانت 23% للمستخلص الزيتي باستعمال جهاز الـ Soxhelt ، وتراوحت النسب المئوية بين 5- 7.1% في المستخلصات الأخرى (الجدول-1-) .وتتقارب هذه النتائج مع ماذكره Abdulah

وجماعته [24] اذ وجد أن نسبة المستخلص 3.4 % باستعمال الكحول الاثيلي و5.7% باستعمال الكلوروفورم.

المركبات الفعالة الموجودة في بذور الحبة السوداء

أظهرت نتائج الكشف الكيميائي احتوائها على معظم المواد الفعالة مثل القلويدات والكلوسيدات والراتنجات والصابونيات والتانينات والكومارينات والفلوفونات (الجدول -2-) ، لقد أشارت الدراسة التي قام بها Atta *et. al.* [37] ان بذور الحبة السوداء تحتوي على قلويدات خاصة بها اطلق عليها Nigellicine و Nigellimine-N- oxid و Nigellidine والتي لا توجد في غيرها من النباتات الطبية الأخرى فضلا عن احتوائها على القلويدات الاخرى . وان احتواء البذورعلى التانينات والراتنجات يتفق مع ما ذكره Charkravarty [38] .

العزل والتشخيص

شخصت 40 عزلة من عينات سريريه وأظهرت النتائج أن أعلى نسبة(22.5%) للبكتريا المعزولة هي *S.aureus* بينما كانت النسب بحدود 5% لكل من *S. epidermidis* و *S. fecales*و *S. marcesens* وكانت أكثر الأحياء المجهرية المعزولة من مسحات الحروق والجروح إذ كانت 13 عزلة (32.5%) و 9عزلات (22.5%) من عينات إدرار و 6 عزلات (15%) لكل من عينات القشع والمسحات المهبلية و 3عزلات (7.5%) من مسحات العيون وعزلتين (5%) من مسحات البلعوم وعزلة واحدة (2.5%) من مسحات الإذن(الجدول -3-) .

اختبار فعالية المستخلصات ضد الأحياء المجهرية .

استعملت في هذه الدراسة 19 عزلة تعود لخمسة أنواع من البكتريا الموجبة لملون غرام و24 عزلة تعود لخمسة أنواع من البكتريا السالبة لملون غرام فضلا عن7عزلات تعود للفطريات. واستعملت طريقتي الحفر وأقراص ورق الترشيح لمعرفة تأثير مستخلصات بذور الحبة السوداء تجاه العزلات قيد الدراسة ، واتسمت طريقة الحفر بالكفاءة في تثبيط اغلب العزلات مقارنة بطريقة أقراص ورق الترشيح (الجدول-4- و -5-) ويمكن أن يعود ذلك لاختلاف انتشار المستخلصات بكلا الطريقتين كما أن أقراص ورق الترشيح لاتستوعب اكثرمن 20 مايكرولتر لكل قرص في حين كانت الحفر الموجودة في الطبق تستوعب 40 مايكرولتر من نفس محلول الخزين للمستخلصات (الذي لايمكن زيادة تركيزه لأكثر من 128ملغرام /مل لمسحوق المستخلصات الكحولي والمائي والدارئ لان المحلول مشبع ، أما المستخلصات الزيتية فتحتاج لإضافة مادة الـ DMSO لكي يتمكن الزيت من الانتشار بالوسط الصلب وبذلك يكون التركيز النهائي بالحفر ضعف ما هو عليه بطريقة الأقراص كما لوحظ في عزلات *P.aeroginosa* والـ *E. coli* والـ *A.niger* اذ لم تظهر أي منطقة تثبيط بطريقة الأقراص مقارنة بمناطق التثبيط الواضحة بطريقة الحفر .

تميز المستخلص OR بقدرته العالية في تثبيط البكتريا الموجبة لملون غرام وتراوحت أقطار التثبيط بين 18.8- 24.6 ملم ،بينما البكتريا السالبة لملون فتراوحت بين 0 – 14.1، أما الفطريات فكانت 9.5 ملم للـ *A.niger* و 23.5 ملم للـ *C.albicans*. واظهر مستخلص OS فعالية اقل من سابقه إذ تراوحت القيم بين 14.6 -23.5 ملم للبكتريا الموجبة لملون غرام في حين كانت 0-13 للبكتريا السالبة لملون غرام ولم يظهر عفن *A.niger* أي منطقة تثبيط إلا أن خميرة الـ *C.albicans* أظهرت منطقة تثبيط واضحة (22 ملم).وكان اقل المستخلصات تأثيرا على الأحياء المجهرية هو مستخلص BE فتراوحت القيم للبكتريا الموجبة لملون غرام بين 0- 19.2 ملم ولم تظهر أي منطقة تثبيط للبكتريا السالبة لملون غرام وكذلك *A.niger* إلا أن منطقة تثبيط للـ *C.albicans* كانت 16.8 ملم .

تحديد التركيز المثبط الأدنى(MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC).

تعد هذه من أهم الطرائق لتحديد الفعالية لكونها طريقة كمية (Quantitative method) وتستعمل لمعرفة تأثير المواد المراد فحصها في قتل الأحياء المجهرية لتحديد الجرعة اللازمة (التركيز المطلوب في المصل او السوائل الجسمية) داخل الجسم الحي .

استعملت طريقة التخفيف بالوسط الصلب وذلك لان استعمال طريقة التخفيف بالوسط السائل (Broth dilution method) قد لوحظ فيها عدم تجانس الزيت مع الوسط وانعزلت الطبقة الزيتية إلى الأعلى وظهور تضبب بالوسط بالنسبة للمستخلصات الأخرى .

أظهرت النتائج المبينة بالجداول 6 و 7 أن بعض العزلات *S. aureus* و *S. epidermidis* و *B. cerreus* و *B. subtilis* و *C.albicans* كانت قيم الـ MBC لها مساوية للـ MIC اما بكتريا الـ *P. aeroginosa* والـ *E. coli* والـ *S. fecales* والعفن *A. niger* فتميزت بظاهرة التحمل Tolerance لان قيم الـ MBC اعلى بكثير من الـ MIC ، فمثلا *P. aeroginosa* كانت قيم الـ MIC لها 1% و 8% و 16 ملغم /مل و 32 ملغم /مل و 64 ملغم /مل لكل من المستخلصات OR و OS و EE و AE و BE على التوالي أما قيم الـ MBC 8% و32% و 64 ملغم /مل و 128 ملغم /مل واكبر من 128 ملغم /مل على التوالي .

وتبين أن أكثر الأحياء المجهرية حساسية تجاه المستخلصات هي البكتريا الموجبة لملون غرام اذ تراوحت قيم الـ MBC لمستخلص OR بين 0.5- 8% ولمستخلص OS بين 2- 32% وتراوحت بين 4-64 ملغم /مل و 16_64 ملغم /مل و 32-128 ملغم /مل لكل من المستخلصات EE و AE و BE على التوالي، تليها خميرة الـ *C.albicans* (قيم الـ MBC لها 4 و 8% لكل من مستخلص ORو OS و 16 ملغم /مل لمستخلص EE و 64 ملغم /مل لكل من مستخلص AEو BE) .

اما البكتريا السالبة لملون غرام قد تباينت فيما بينها اذ لم تظهر بكتريا *K. pneumoniae* و *P. mirabilis* و *S. marcesens* أي تأثر بالمستخلصات المحضرة ، أما *E.coli* فأظهرت تحسساً ببعض المستخلصات فكانت قيم الـ MBC 64% لكل من OR و OS ولم تظهر EE و AE و BE فعالية تجاهها، بينما كانت *P. aeroginosa* اكثرها حساسية للمستخلصات الا ان قيم الـ MBC اعلى بكثير من الـ MIC وكما وُضح سابقاً.

اعتماداً على النتائج التي ذكرت آنفا يكون المستخلص الزيتي بالكحول الاثيلي باستعمال الـ Reflux (OR) أكثر فعالية في قتل الأحياء المجهرية من المستخلص الزيتي بالكحول الاثيلي باستعمال الـ Soxhelt (OS) يليه المستخلص بالكحول الاثيلي (EE) ثم المستخلص بالماء المقطر (AE) واقلها فعالية هو المستخلص بدارئ الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 7 (BE) وهذه النتائج تتفق مع دراسات سابقة [29و30] تشير إلى آن المستخلص الكحولي أفضل في قتل الأحياء المجهرية من المستخلص المائي .

ومن خلال الدراسة الحالية نستنتج أن لمحلول الاستخلاص وطريقة الاستخلاص تأثيراً واضحاً في فعالية المستخلص الناتج وذلك لاختلاف في المكونات الفعالة المستخلصة في كل طريقة .

وهذه الدراسة تشجع لتنقية المكونات الفعالة لاستعمالها بأشكال صيدلانية لعلاج الأحياء المجهرية الممرضة المتعددة المقاومة التي يتعذر علاجها بالمضادات الحيوية المتوفرة حالياً ،علماً ان المستخلصات الخام اظهرت فعالية عالية ضد عدد من الأحياء المجهرية المعزولة سريريا التي شكلت نسبة عالية وهي *S. aureus* و *C.albicans* و *P. aeroginosa*

الجدول (1): النسب المئوية للمستخلصات الخام بذور الحبة السوداء

المستخلصات	الرمز	النسبة المئوية
المستخلص الزيتي بأستعمال Soxhelt	OS	% 23
المستخلص بالكحولي الاثيلي (Ethanol Extract)– المسحوق	EE	% 5.5
– الزيت بأستعمال Reflux	OR	% 5
المستخلص المائي (Aqueous Extract)	AE	% 7.1
المستخلص بدارئ الفوسفات (Buffer Extract)	BE	% 6.3

الجدول (2): المركبات الفعالة الموجودة في بذور الحبة السوداء

المركبات الفعالة	الكاشف	النتيجة	
القلويدات	أ– كاشف واكنر	راسب بني	(+)
	ب– كاشف ماير	راسب ابيض	(+)
التانينات	خلات الرصاص 1%	راسب ابيض هلامي	(+)
الكلوكوسيدات	كاشف فهلنك	راسب احمر	(+)
الراتنجات	غلي المستخلص الكحولي واضافة ماء مقطر محمض	عكارة	(+)
الصابونيات	أ– رج المستخلص المائي	رغوة كثيفة لمدة طويلة	(+)
	ب– كلوريد الزئبقيك	راسب ابيض	(+)
الكومارينات	هيدروكسيد الصوديوم (U.V.)	ظهور لون اخضر مزرق	(+)
الفلافونات	كحول اثيلي (مع هيدروكسيد الصوديوم)	ظهور لون اصفر	(+)

+ الفحص موجب

الجدول (3): مصادر العزلات السريرية واعدادها والنسب المئوية لها .

العزلات السريرية	العدد (النسبة المئوية)	مصدر العزل						
		ادرار	قشع	مسحات				
				حروق وجروح	مهبلية	عيون	بلعوم	اذن
Staphylococcus aureus	9 (% 22.5)	1	1	4	0	1	2	0
Pseudomonas aeroginosa	6 (% 15)	0	2	2	0	2	0	0
Escherichia coli	6 (% 15)	2	0	2	2	0	0	0
Candida albicans	5 (% 12.5)	1	0	0	4	0	0	0
Klebsiella pneumoniae	5 (% 12.5)	0	3	2	0	0	0	0
Proteus mirabilis	3 (% 7.5)	1	0	1	0	0	0	1
Serratia marcesens	2 (% 5)	1	0	1	0	0	0	0
Staphylococcus epidermidis	2 (% 5)	1	0	1	0	0	0	0
Streptococcus fecales	2 (% 5)	2	0	0	0	0	0	0
المجموع (النسبة المئوية)	**40 % 100**	**9 %22.5**	**6 % 15**	**13 %32.5**	**6 % 15**	**3 %7.5**	**2 %5**	**1 %2.5**

الجدول (4): معدلات أقطار مناطق التثبيط (ملي متر) بطريقة أقراص ورق الترشيح للمستخلصات الخام لبذور الحبة السوداء

الأحياء المجهرية		التركيز 50 % للمستخلص الزيتي باستعمال		التركيز 128 ملغرام /مل للمستخلصات		
		(OR) Reflux	(OS) Soxhelt	الكحولي (EE)	المائي (AE)	الدارئ (BE)
بكتريا موجبة لملون غرام	*Staphylococcus aureus*	19.5	18.9	18	16.9	15.5
	Staphylococcus epidermidis	18.6	17.1	16.5	14.2	0
	Streptococcus fecales	15.03	12.2	11.8	0	0
	Bacillus cerreus	19.4	19	18.1	16.9	15.8
	Bacillus subtilis	19.1	18.5	17.5	15.5	0
بكتريا سالبة لملون غرام	*Pseudomonas aeroginosa*	0	0	0	0	0
	Escherichia coli	0	0	0	0	0
	Klebsiella pneumoniae	0	0	0	0	0
	Proteus mirabilis	0	0	0	0	0
	Serratia marcesens	0	0	0	0	0
فطريات	*Candida albicans*	18	17.6	16.5	12	11.8
	Aspergillus niger	0	0	0	0	0

الجدول (5) : معدلات أقطار مناطق التثبيط (ملي متر) بطريقة الحفر للمستخلصات الخام لبذور الحبة السوداء

الأحياء المجهرية		التركيز 50 % للمستخلص الزيتي باستعمال		التركيز 128 ملغرام /مل للمستخلصات		
		(OR) Reflux	(OS) Soxhelt	الكحولي (EE)	المائي (AE)	الدارئ (BE)
بكتريا موجبة لملون غرام	*Staphylococcus aureus*	24.6	23.4	22.3	20.4	19.2
	Staphylococcus epidermidis	23.5	21.3	20	18	12.5
	Streptococcus fecales	18.8	14.6	13.3	10.5	0
	Bacillus cerreus	24.5	23.5	22.2	20.3	19
	Bacillus subtilis	23.8	22.1	20.3	18.4	13.4
بكتريا سالبة لملون غرام	*Pseudomonas aeroginosa*	14.1	13	9.5	9	0
	Escherichia coli	11.5	8.8	7.8	0	0
	Klebsiella pneumoniae	0	0	0	0	0
	Proteus mirabilis	0	0	0	0	0
	Serratia marcesens	0	0	0	0	0
فطريات	*Candida albicans*	23.5	22	21.7	19.2	16.8
	Aspergillus niger	9.5	0	0	0	0

الجدول (6) : قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصات الخام لبذور الحبة السوداء

ملغرام / مل (وزن / حجم) للمستخلصات			% (حجم /حجم) للزيت باستعمال		الأحياء المجهرية	
الدارئ(BE)	المائي(AE)	الكحولي(EE)	(OS) Soxhelt	(OR) Reflux		
32	16	4	2	0.5	*Staphylococcus aureus*	بكتريا موجبة لملون غرام
64	32	16	4	2	*Staphylococcus epidermidis*	
64	32	32	16	4	*Streptococcus fecales*	
32	16	4	2	0.5	*Bacillus cerreus*	
64	32	8	4	1	*Bacillus subtilis*	
64	32	16	8	1	*Pseudomonas aeroginosa*	بكتريا سالبة لملون غرام
128	128	64	32	16	*Escherichia coli*	
> 128	> 128	> 128	> 64	> 64	*Klebsiella pneumoniae*	
> 128	> 128	> 128	> 64	> 64	*Proteus mirabilis*	
> 128	> 128	> 128	> 64	> 64	*Serratia marcesens*	
64	64	16	8	4	*Candida albicans*	فطريات
>128	>128	128	32	4	*Aspergillus niger*	

الجدول (7) : قيم التركيز القاتل الأدنى (MBC) للمستخلصات الخام لبذور الحبة السوداء

ملغرام / مل (وزن / حجم) للمستخلصات			% (حجم /حجم) للزيت باستعمال		الأحياء المجهرية	
الدارئ(BE)	المائي(AE)	الكحولي(EE)	(OR) Reflux	(OR) Reflux		
32	16	4	2	0.5	*Staphylococcus aureus*	بكتريا موجبة لملون غرام
64	32	16	4	2	*Staphylococcus epidermidis*	
128	64	64	32	8	*Streptococcus fecales*	
32	16	4	2	0.5	*Bacillus cerreus*	
64	32	8	4	1	*Bacillus subtilis*	
>128	128	64	32	8	*Pseudomonas aeroginosa*	بكتريا سالبة لملون غرام
>128	>128	128	> 64	64	*Escherichia coli*	
>128	>128	>128	> 64	> 64	*Klebsiella pneumoniae*	
>128	>128	>128	> 64	> 64	*Proteus mirabilis*	
>128	>128	>128	> 64	> 64	*Serratia marcesens*	
64	64	16	8	4	*Candida albicans*	فطريات
>128	>128	>128	64	16	*Aspergillus niger*	

References

1. Chevallier A**.1996.** "*The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley puplishers*", London, P. 237.
2. Kaseb A. O., Chinnakannu K. ,Chen D., Sivanandam A. , Tejwani S., Menon M., Dou Q.P. and Reddy G.P**.2007.** "*Androgen receptor and E2F-1- Targeted Thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer*". Cancer research 67(16) : 7782-8
3. Musa D., Dilsiz N. , Gumush H. , Ulakoglu G. and Bitiren M**.2004."** *Antitumor activity of an ethanol extract of Nigella sativa seeds*" .Biologia ,Bratislava , 59(6): 735-740.
4. Salim EI, Fukushima S.**2003.** "*Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (Nigella sativa L.) seeds against rat colon carcinogenesis*". Nutr Cancer.;45(2):195-202.
5. Farah IO, Begum RA**.2003. "***Effect of Nigella sativa (N. sativa L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells*". Biomed Sci Instrum.39:359-64
6. Mahmood MS, Gilani AH, Khwaja A, Rashid A, Ashfaq MK**.2003. "***The in vitro effect of aqueous extract of Nigella sativa seeds on nitric oxide production*". Phytother Res. Sep;17(8):921-4
7. Al-Ghamdi MS **. 2001 . "***The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of Nigella sativa".* J Ethnopharmacol . Jun ;76(1):45-8.
8. Badary OA , Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. **2000.** "*The influence of thymoquinone on doxorubicin - induced hyperlipidemic nephropathy in rats* " . Toxicology. 2000 Mar 7 ; 143(3):219-26
9. Al-Ghamdi MS**.2003.** "*Protective effect of Nigella sativa seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage*". Am J Chin Med. 31(5):721-8
10. Turkdogan MK, Ozbek H, Yener Z, Tuncer I, Uygan I, Ceylan E**.2003. "***The role of Urtica dioica and Nigella sativa in the prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats*". Phytother Res. Sep;17(8):942-6.
11. Iddamaldeniya SS , Wickramasinghe N , Thabrew I , Ratnatunge N , Thammitiyagodage MG . **2003** . "*Protection against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenesis by an indigenous medicine comprised of Nigella sativa, Hemidesmus indicus and Smilax glabra*" : a preliminary study . J . Carcinog. Oct 18 ; 2(1):6
12. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S**. 2003. "** *Gastroprotective activity of Nigella sativa oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats*". J Ethnopharmacol. Feb;84(2-3):251-8.
13. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM**.2000."** *Effects of Nigella sativa oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats*". Ethnopharmacol. Sep;72(1-2):299-304.
14. El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI . **2004 .** "*Thymoquinone and Nigella sativa oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats*". Int J Cardiol. Jan;93(1):19-23
15. Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M**.2002.**" *Effects of Nigella sativa fixed oil on blood homeostasis in rat*". J Ethnopharmacol. Jan;79(1):23-6
16. Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois MA, Settaf A, Amarouch H, Hassar M**.2000.** "*Diuretic and hypotensive effects of Nigella sativa in the spontaneously hypertensive rat. Therapie*". May-Jun;55(3):379-82.
17. Kanter M , Meral I , Yener Z , Ozbek H , Demir H **. 2003 .** "*Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by Nigella sativa L. in streptozotocin-induced diabetic rats*". Tohoku J Exp Med Dec ; 201(4) :213-9
18. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N**.2001** *"Effect of Nigella sativa on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits*". J. Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. Dec;48(10):593-9
19. Kanter M, Meral I, Dede S, Gunduz H, Cemek M, Ozbek H, Uygan I. **.2003**. *"Effects of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl4-treated rats".* . J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. Jun;50(5):264-8.
20. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH**.2003.** *"Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenge*r. *Drug Chem Toxicol*". May;26(2):87-98

21. Kalus U, Pruss A, Bystron J, Jurecka M, Smekalova A, Lichius JJ, Kiesewetter H**.2003.** *"Effect of Nigella sativa (black seed) on subjective feeling in patients with allergic diseases"*. Phytother Res . Dec ;17(10):1209-14.
22. Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA, El-Kashef HA .**2001**. "*Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. Res Commun Mol Pathol Pharmaco" l*.110(5-6):333-45.
23. Gilani AH , Aziz N , Khurram IM , Chaudhary KS, Iqbal A **.2001.** *"Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of Nigella sativa seeds*" (Kalonji) : a traditional herbal product with multiple medicinal uses . J Pak Med Assoc . Mar ; 51(3):115-20.
24. Zainal-Abidin BAH. **2007.** "*In vivo anti-malarial tests of Nigella sativa (black seed) different extracts*". American Journal of Pharmacology and Toxicology 2 (2): 46-50, . 28
25. Zainal-Abidin BAH **.2007.** " *Curative and prophylactic anti-malarial activities of Nigella sativa (black seed) in mice".* The Malaysian Journal of Medical Sciences 14: 209.
26. Ekanem J. T. and Yusuf O.K**.2008**." *Some biochemical and haematological effects of black seed (Nigella sativa) oil on T. brucei-infected rats"* . African Journal of Biomedical Research, Vol. 11 ; 79 – 85.
27. Ahtar MS and Riffat S**. 1991. "***Field trial of Saussurea lappa roots against nematodes and Nigella sativa against cestodes in children"*. J Pak Med Assoc; 41:185-7.
28. Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH**.2003**. "*The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from Nigella sativa seeds"*. Phytother Res. Feb;17(2):183-6
29. Hosseinzadeh H. Bazzaz F., and Haghi M. **2007. "***Antibacterial Activity of Total Extracts and Essential oil of Nigella Sativa"* L. Seeds in Mice. Pharmacolgyonline 2: 429-435
30. Mashhadian NV. and Rakhshandeh H **. 2005 ."***Antibacterial and antifungal effects of Nigella sativa extracts against S"*. aureus, P.aeroginosa and C. albicans.Pak J Med Sci . 21(1): 47-52
31. Morsi NM **. 2000 .** *"Antimicrobial effect of crude extracts of Nigella sativa on multiple antibiotics - resistant bacteria* " . Acta Microbiol Pol .;49(1):63-74
32. Fahmy, I . R **.1933 .** " *Constituents of plant crad drugs* ". 1st . Ed - Poul Barbey –Cairo . Egypt.
33. Shihata , I.M**.1951. "***A pharmacological study of Anagallis arvensis" M.D. vet*. Thesis Cairo University.
34. Jaffer , H . J ., Mahmod , M . J., Jawad.A.M., Naji A . and Al-Naib A **. 1988 .***" Phytochemical and Biological screeining of Iraqi plant"*. Fitoterapia LIX No.3, 229-233.
35. Holt, J.C.; Krieg, N.R.; Sneath, A.; Staley, J.T.; and Williams, S.T**.1994**. "*Bergy's manual of determinative bacteriology"*. 9th edition Williams and Wiken.
36. Miles, R . S . and Amyes , S . G . B **.1996 .** " *Laboratory control of antimicrobial theropy.In: Mackie and MacCartney Practical Medical Microbiology by Collee*", J.G.; Fraser, A.G.;Marmion, B.P. and Simmons. A.4th edition, Churchill Livingstone. P:151-178.
37. Atta UR, Malik SO. **1995**. Nigellidine, a new indazole alkaloid from seeds of *Nigella sativa*. J. Res Iinst; 36: 1993-1996
38. Chakravarty , H . L**. 1976 .***"Plant Wealth of Iraq"* , (A . Dictionary of Economic Plant) .Vol.IMinistry of Agriculture and Ararian Reform Baghdad,Iraq .P39-41.