

اثرات عصاره روغنی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) بر باکتری استافیلوکوکوس طلایی استاندارد و مقایسه اثر آن با آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفوروکسیم، سفاکلور و سفاماندول

محمد نیاکان^{۱*}، سیدروح‌الله میری^۲، محسن ناصری^۳، مهرداد کریمی^۲، صادق منصوری^۴

۱- استادیار، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۲- دانش‌آموخته، پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۳- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۴- کارشناس، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

*آدرس مکاتبه: تهران، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ (۰۲۱)، نامبر: ۸۸۹۶۶۳۱۰ (۰۲۱)

پست الکترونیک: Niakan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۲۵

تاریخ تصویب: ۸۴/۷/۱۳

چکیده

مقدمه: استفاده از اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی از گذشته‌های دور مورد نظر بوده است. تحقیقات اخیر نیز در این زمینه نشانگر اهمیت و کاربرد این گونه گیاهان است. در مورد سیاه‌دانه نیز گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر ضد میکروبی وجود دارد. هدف: در این مطالعه تاثیر ضد میکروبی روغن دانه‌های سیاه‌دانه علیه دو گونه از باکتری‌های استافیلوکوکوس طلایی مورد آزمایش و سنجش قرار گرفته و پس از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) آن، با برخی از آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی مقایسه شده است. روش بررسی: در این بررسی از سیاه‌دانه تحت شرایط فشار در سرما عصاره روغنی تهیه گردید، سپس دوسویه استاندارد باکتری استافیلوکوکوس طلایی (ATCC ۱۱۱۲، ۲۵۷۲) فعال و در محیط کشت تریپتی کیس سوی بروث، رقت استاندارد (MF ۰/۵) آماده شد. از عصاره روغنی سیاه‌دانه (رقت ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۰۶، ۰/۰۳ درصد) سوسپانسیون میکروبی تهیه و مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شده و نتایج ثبت گردید. جهت سنجش حساسیت میکروارگانیسم‌ها از دیسک‌های حاوی ۳۰ میکروگرم آنتی‌بیوتیک (ساخت شرکت دیفکو) و روش انتشار دیسک (کربی-بائر) استفاده و با تاثیر عصاره روغنی مقایسه شد.

یافته‌ها: تاثیر عصاره روغنی سیاه‌دانه در رقت ۱/۱۶ برابر MIC باکتری استافیلوکوکوس طلایی (۲۵۷۲) و در رقت ۱/۱۰ معادل MIC سویه (۱۱۱۲) بود. میزان اثر عصاره خالص و رقت‌های ۰/۱۲۵ و ۰/۲۶ با حساسیت باکتری‌ها نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به کار رفته برابری داشت. نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه و برخی از بررسی‌های مشابه با سایر باکتری‌ها، به نظر می‌رسد عصاره روغنی سیاه‌دانه اثر ضد استافیلوکوکی مناسبی داشته و با تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفوروکسیم، سفاکلور و سفاماندول در شرایط آزمایشگاهی قابل مقایسه است. با انجام بررسی‌های تجربی بیشتر می‌توان از تاثیر ضد میکروبی عصاره روغنی سیاه‌دانه در کنترل و درمان عفونت‌های باکتریایی استافیلوکوکوس استفاده نمود.

کلواژگان: سیاه‌دانه، آنتی‌بیوتیک‌ها، عصاره روغنی، استافیلوکوکوس طلایی

مقدمه

بررسی جامع و اختصاصی در مورد فعالیت ضدآستافیلوک طلایی سیاه‌دانه انجام نشده است برآن شدیم تا این تاثیر و حداقل میزان غلظت مهاري (Minimum Inhibitory Concentration) MIC سیاه‌دانه را تعیین و با آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم^۱، سفامکلاز^۲، سفامندول^۳ و سفوروکسیم^۴ مورد مقایسه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

مرحله اول: سیاه‌دانه از سه محل جداگانه (شهرهای تبریز، مشهد و شیراز) تهیه و با کمک بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی شاهد مورد شناسایی و تایید قرار گرفت. دانه‌ها را پس از تمیز نمودن، شستشو و خشک کردن، در شرایط سرما (۸-۴ درجه سانتی‌گراد) و با استفاده از دستگاه فشار (پرس) روغن‌گیری به عمل آمد، روغن حاصل شده در دستگاه میکسر هموژن و یکنواخت گردید. در شرایط استریل وسایل و مواد مورد نیاز آزمایش آماده گردید. تلقیح^۵ سوسپانسیون میکروبی سروتیپ‌های *S. aureus* (ATCC 1112, 2572) در محیط کشت تریپتی کیس سوی بروث^۶ به روش Dilution Method آماده شد. پس از آماده‌سازی استاندارد MCFarland (طبق روش NCCLS)، سوسپانسیون میکروبی معادل MF ۰/۵ (با کدورت‌سنجی Turbidometry) تهیه گردید. متعاقباً رقت سریال از روغن سیاه‌دانه در دوازده لوله آزمایش آماده شد. پس از انتخاب این لوله‌های استریل به هر لوله ۱ ml سوسپانسیون میکروبی 5×10^8 CFU/ml ریخته و شماره‌گذاری شد و متعاقباً به هر لوله ۱ ml از رقت‌های مختلف روغن سیاه‌دانه افزوده گردید. لذا هر لوله ۲ml سوسپانسیون خواهد داشت. در لوله کنترل (شماره صفر) بدون روغن سیاه‌دانه، لوله شماره یک حاوی روغن خالص و در لوله‌های بعدی رقت‌های سریال مختلف از روغن سیاه‌دانه افزوده شد. پس از مخلوط نمودن کامل لوله با ورتکس^۷ به میزان ۰/۵ ml از هر مخلوط روی

گسترش روزافزون مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان بیماری‌های عفونی را مشکل و پرهزینه کرده است [۱]، از طرفی دیگر درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد. گیاهان دارویی که مزیت‌های متعددی از قبیل ارزان و قابل دسترس بودن و سازگاری با طبع و پذیرش بهتر توسط بیماران را دارند، امروزه برای درمان بیماری‌ها از جمله عفونت‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲،۳،۴،۵]. یکی از این گیاهان دارویی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) از خانواده آلاله^۱ است که در طب سنتی موارد مصرف متعددی دارد و از آن در درمان بیماری‌های مختلف از جمله سردرد، میگرن، دیسمنوره، چاقی، پارپلژی، اختلالات گوارشی، بیماری‌های تنفسی و کلیوی، پرفشاری خون، درمان آکنه و اگزما استفاده می‌شود [۶،۷،۸].

نام‌های دیگر این گیاه در جنوب آسیا، Black Cumin و Sinouj است و نام عربی آن حب‌السودا^۲ است، در تاثیر درمانی آن حضرت رسول (ص) بسیار تاکید نموده‌اند و طیب بزرگ بخاری (Bukhari) آن را داروی هر درد به جز مرگ دانسته‌اند. مطالعات فیتوشیمیایی آن نشان می‌دهد که دانه‌های این گیاه حاوی مواد مختلفی مانند Nigellin، Volatile oil و Nigellicine است [۹]. علاوه بر خواص یاد شده از این گیاه جهت ترمیم زخم‌ها، ضدمسمومیت، ضدچربی بدن، ضدافسردگی، آنالژیک، درمان ناباروری، ضدسرطان، به عنوان کنترل بارداری^۳، مهارکننده آزادسازی هیستامین در بدن، ضدالتهاب، ضددیابت، ضدباکتری‌های سودومونا آئروژینوزا و اشریشیاکلی ضداسپاسم و محافظت‌کننده مجاری کلیوی بهره گرفته می‌شود [۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵].

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های استافیلوکوک طلایی، مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در مقابل این باکتری و اینکه در بررسی‌های قبلی اثرات آن بر برخی از باکتری‌های گرم منفی (سودومونا آئروژینوزا و اشریشیاکلی) در محیط آزمایشگاه به اثبات رسیده است و با عنایت به اینکه تاکنون

^۱ Ceftazidime (CAZ)^۲ Cefaclor (CEC)^۳ Cefamandole (MAN)^۴ Cefuroxime (CXM)^۵ Inoculum^۶ Trypticase Soybroth (TSB)^۷ Vortex^۱ Ranunculaceae^۲ Habat-ul-Sauda^۳ Post Coital contraceptive

نتایج تعیین حساسیت و MIC عصاره سیاه‌دانه با هم قابل مقایسه بوده و نشان داده شد که عصاره به کار رفته در رقت‌های ۰/۱۲۵ درصد (جهت *S. aureus*-2572) و ۰/۰۶۲۵ درصد (جهت *S. aureus*-1112) تاثیر ضد میکروبی معادل قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های فوق را نسبت به سویه‌های *S. aureus* اعمال نموده و قابل مقایسه است. بدین ترتیب که در رقت $\frac{1}{16}$ عصاره معادل MIC و هاله عدم رشد باکتری *S. aureus*-2572 با هم برابری دارند و این موضوع در خصوص *S. aureus*-1112 در رقت $\frac{1}{8}$ حاصل گردید (جدول شماره ۲ و ۳).

بحث

یافته‌ها نشان دادند که عصاره روغنی سیاه‌دانه تاثیر ضد میکروبی مناسبی را نسبت به سویه‌های استافیلوکوک طلائی اعمال می‌نماید و این خاصیت در رقت‌های ۱/۱۶ و ۱/۱۰ با اثر آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی سفوروکسیم، سفاکلور، سفاماندول و سفنازیدیم برابری می‌کند. با توجه به اینکه هر ساله هزینه‌های هنگفتی صرف واردات آنتی‌بیوتیک‌های تخصصی به صورت مواد اولیه یا آماده می‌شود [۱۷]، اثرات ضد استافیلوکوک طلائی پیدا شده در عصاره روغنی سیاه‌دانه از جنبه علمی و اقتصادی حایز اهمیت است و می‌تواند بخشی از نیازهای کشور به داروهای وارداتی را کاهش دهد و در این زمینه این گیاه می‌تواند جهت درمان برخی از بیماری‌های عفونی یک انتخاب مناسب باشد ولی برای رسیدن به فرآورده‌های دارویی باید جنبه‌های بیشتری از اثر این گیاه بر میکروارگانیسم‌ها مشخص شود، از این رو قدم بعدی برای شناخت بیشتر فعالیت ضد استافیلوکوک طلائی می‌تواند شناسایی اجزای مؤثر موجود در عصاره روغنی و تعیین ساختار مولکولی آن باشد. با توجه به اینکه اثرات سیاه‌دانه بر روی باکتری‌های سودومونا آئروژینوزا و اشریشیاکلی در بررسی‌های

پلیت حاوی ۴ میلی‌متر قطر محیط کشت جامد مولر هیتتون^۱ برده و کاملاً پخش کردیم (بنابراین به تعداد لوله‌ها پلیت کشت نیز داشتیم) پس از یک شب گرمخانه‌گذاری^۲ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد از هر لوله روی محیط مولر هیتتون کشت را انجام و کلنی‌ها شمارش گردیدند و لوله‌های اولیه پس از گرمخانه‌گذاری جلوی نور بررسی و به ترتیب شماره از نظر کدورت نتایج ثبت شدند. اولین لوله شفاف پس از سری لوله‌های با کدورت میکروبی، نشانگر MIC روغن سیاه‌دانه است. تعداد کلنی رشد کرده همین لوله در پلیت تهیه شده نیز نشانگر میزان واحد ایجاد کننده کلنی (CFU) است.

مرحله دوم: پس از انتخاب چهار نمونه از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک اختصاصی: (از شرکت Difco) که حاوی ۳۰ میکروگرم سفوروکسیم (CXM)، سفاکلور (CEC)، سفاماندول (MAN) و سفنازیدیم (CAZ) با روش انتشار دیسک^۳ میزان حساسیت و مقاومت باکتری‌های فوق‌الذکر طبق شرایط یاد شده مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت. طبق جدول سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی^۴ دیسک‌ها، قطر هاله عدم رشد^۵ بیشتر یا مساوی ۱۸ میلی‌متر (معادل $\geq 32 \text{ mcg/ml}$ هاله ایجاد شده توسط تاثیر ضد میکروبی روغن سیاه‌دانه با قطر هاله دیسک‌های استاندارد حاوی ۳۰ میکروگرم آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده سنجیده شد [۱۶] (جدول شماره ۱).

نتایج

میزان MIC حاصل از رشد لوله‌ها ثبت و به همین تعداد نیز پلیت بررسی میزان رشد کلنی داشتیم (CFU). از طرفی نتایج سنجش میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های ذکر شده نیز حاصل گردید. بررسی اطلاعات حاصله نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب $\text{CXM}=36$ ، $\text{CEC}=28.5$ ، $\text{MAN}=24$ و $\text{CAZ}=19.5$ میلی‌متر است.

¹ Muller hinton

³ Kirby bauer

⁵ Inhibition Zones

² Incubation

⁴ Susceptible

جدول شماره ۱- میزان حساسیت و مقاومت سویه‌های *S. aureus* نسبت به دیسک آنتی‌بیوتیک‌های MAN, CEC, CXM و CAZ بر اساس اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد بر اساس جدول ذیل مورد سنجش قرار گرفته است.

قطر هاله عدم رشد	Susceptible (حساس)	Resistant (مقاوم)	Aproximate-MIC
	میلی متر ≥ 18	$\geq 32 \text{ mcg/ml}$	$\leq 8 \text{ mcg/ml}$

جدول شماره ۲- عصاره روغن سیاه‌دانه در رقت ۰/۱۲۵ درصد جهت *S. aureus* ATCC-2572 اثر ضد میکروبی معادل قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های MAN, CEC, CXM و CAZ است.

سویه باکتری	درصد رقت سریال عصاره روغن سیاه‌دانه									
<i>S. aureus</i> 2572	۱۰۰	۷۵	۵۰	۲۵	۱	۰/۷۵	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۱۲۵	...
قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۵	۰۰۰

جدول شماره ۳- عصاره روغن سیاه‌دانه در رقت ۰/۰۶۲۵ درصد جهت *S. aureus* ATCC-1112 اثر ضد میکروبی معادل قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های MAN, CEC, CXM و CAZ است.

سویه باکتری	درصد رقت سریال عصاره روغن سیاه‌دانه									
<i>S. aureus</i> 1112	۱۰۰	۷۵	۵۰	۲۵	۱	۰/۷۵	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۰۶۲۵	...
قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۳	...

به طور خلاصه می‌توان نتیجه گرفت عصاره روغنی سیاه‌دانه اثر ضد میکروبی مناسبی بر سویه‌های استافیلوکوک طلایی استاندارد و مقاوم به اثر آنتی‌بیوتیک‌ها را اعمال می‌کند که با آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی سفوروکسیم، سفنازیدیم، سفاکلور و سفاماندول در رقت‌های بالا قابل مقایسه است. لذا می‌توان توصیه نمود پس از مطالعات بالینی بیشتر از اشکال دارویی عصاره روغنی سیاه‌دانه در عفونت‌های استافیلوکوک طلایی مقاوم به درمان (به خصوص در برخی از عفونت‌های پوستی) استفاده شود.

قبلی به اثبات رسیده و مشخص گردیده که عصاره سیاه‌دانه اثرات سینرژیک با آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و جنتامایسین دارد [۱۴] و همچنین با توجه به اثر ضد استافیلوکوک طلایی آن این احتمال مطرح می‌شود که اثر عصاره روغنی سیاه‌دانه بروی دیواره سلول باکتری است. با توجه به اثبات اثرات ضد میکروبی سیاه‌دانه و همچنین اثر ضدقارچی آن [۱۸، ۱۹] این احتمال نیز مطرح می‌گردد که این گیاه اثرات توقف‌کنندگی رشد روی یوکاریوت‌ها و نیز پروکاریوت‌ها داشته باشد.

منابع

- Weinstine Robert A. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. *Emerging Infectious Disease*, 2001; 7 (2): 188-192.
- Mosaddegh M, Naghibi F. Iran Traditional Medicine: Past & Present. *Traditional Medicine & Materia medica*, TMRC. 2002; 1: pp: 2-20.
- WHO Traditional Medicine Strategy. 2002-

2005. Geneva 2002, 1-3, 43-47.
4. The promotion & development of traditional medicine-report of a WHO meeting. WHO Report series. Switzerland. 1978, 622: 8-13, 36-9.
 5. Mozaffarian V, A dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser. Tehran. 1996, P. 522.
 6. Mahfuz M, Abdel-Mguid R, El-Dakhakhny M, Effectiveness of *Nigella* in Asthma. *Alexandria Med.* 1960; 6: 543-47.
 7. Riaz M, Syed M, Chaudhary FM. Chemistry of Medicinal plants of the genus *Nigella*. *Hamdard Medicus* 1996; 39:40-45.
 8. Hassan M, El-Dakhakhny M. Effect of some *Nigella sativa* constituents on chemical carcinogenesis in hamster cheek pouch. *J. Egypt Soci. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 11:675-77.
 9. Tahir K, Ashour E. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa* L.) in rats, elucidation of mechanism of action. *Gen Pharmacol.* 1993; 24: 1123-31.
 10. Abdel – Fattan AFM, Mataumoto K, watanabe H. Anti nociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 400: 89-97.
 11. Hosseinzadeh H, Ramezani M, Namjo N. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angostifolia* fruit seeds in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 84: 275-78.
 12. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. 8th ed. Mc Graw-Hill. New York. 2001, pp: 457-59.
 13. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The invitro anti-tumor activity of black seed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res.* 1998; 18:1527-32.
 14. Hanafy MS, Hatem MG. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethno. Pharmacol* 1991; 275-8.
 15. Keshri G, Singh MM, Lakshmi Vikamboj VP; Post coital contraceptive efficacy of the seeds of *Nigella sativa* in rats. *Indian. J. Physiol. Pharmacol.* 1995; 59-62.
 16. Franklin Tg, and sniw GA. Biochemistry of Antimicrobial action. Chapman & Hall. New York. 1991.
۱۷. محمدی حلیمه، اثر ضدباکتری گیاه پلک روی چند گونه میکروبی. پایان نامه دکترای حرفه‌ای پزشکی، دانشگاه شاهد ۱۳۸۳. کد ۱۵۴-پ، صفحات ۵۰-۴۷.
18. Khan MA, Ashfaq MK. The invivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytother. Res.* 2003; 17 (2): 83-6.
 19. Aljabre S, Randhowa MA. Antidematophye activity of extract of *Nigella sativa* and its active principle thymoquinone. *Hamdard Medicu* 2005; 55: 32-36.