عزل بكتيريا ممرضة مصاحبة لالتهاب القدم السكري وتقييم تأثير بعض المضادات الحيوية وزيت حبة البركة عليها

الهادي محمد القويري

قسم الاحياء الدقيقة / كلية العلوم مصراتة / جامعة مصراتة

Email: H. elquweri @sci.misuratau.edu.ly

Submission data : 21. 11.2024 Acceptance data: 24. 12 .2024 Electronic publishing data: 27.12.2024

المخلص: هدفت الدراسة الى عزل وتعريف البكتيريا المصاحبة للقدم السكري، وإختبار حساسيتها للمضادات الحيوية شائعة الاستخدام وتقييم مدى فاعلية زيت حبة البركة عليها باستخدام طريقة أقراص الترشيح الورقية Filter Paper Disc Diffusion Method. جمعت 40 عينة من الانسجة المصابة بحالات قدم السكري لمترددين على العيادات الخارجية بمستشفى الحكمة التخصصي بمدينة مصراتة من كلا الجنسين وبفئات عمرية مختلفة حيث تفاوتت أعمارهم ما بين 34 حتي 84 سنة خلال الفترة من 28/ 4/ 2024 الى 1/ 5/ 2024م. بلغ عدد المترددين من الذكور 28 حالة (70%) فيما كانت نسبة المترددين من الاناث 12 حالة (30%). عزلت من العينات المدروسة 33 عزلة بكتيرية اشتملت على 16 عزلة لبكتيريا *Staphylococcus aureus* و 5 عزلات لكل من *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و4 عزلات لبكتيريا *Klebsiella pneumoniae* و عزلتان *Enterococcus faecalis* و عزلة *Streptococcus pyogenes*. أظهرت نتائج الدراسة أن بكتيريا *Staphylococcus aureus* كانت الأكثر شيوعا بين المترددين بنسبة 48.5%، تليها بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* بنسبة 15.15% لكل منهما.

كلمات مفتاحية: القدم السكري، حبة البركة، الحبة السوداء، مقاومة للمضادات الحيوية،

المقدمة

القدم السكري هي إحدى المضاعفات الخطيرة لداء السكري، والتي تحدث نتيجة لارتفاع مستويات السكر في الدم لفترات طويلة، حيث أن جروح قدم مرضى السكري تعرضهم للعدوى بسهولة وتحتاج الى علاج سريع لتجنب مضاعفات خطيرة مثل الغرغرينا والتي قد تؤدي الى بتر الاطراف في حالة عدم علاجها. و يمكن أن تؤدي الى تلف الاعصاب (الاعتلال العصبي السكري) وضعف الدورة الدموية، مما يزيد من مخاطر الاصابة بالتقرحات والجروح، و تلعب البكتيريا دورا حاسما في تفاقم هذه الاصابات [1].

عندما تتعرض قدم مريض السكري للجروح أو التقرحات، فأن الجهاز المناعي الضعيف بسبب السكري يجعل من الصعب على الجسم محاربة العدوى بشكل فعال. البكتيريا يمكن أن تصيب الجروح بسهولة، مما يؤدي الى التهابات شديدة قد تتطلب العلاج بالمضادات الحيوية أو حتى التدخل الجراحي في الحالات الخطيرة إذا لم يتم علاج هذه الالتهابات بشكل جيد، وقد تؤدي إلى مضاعفات أكثر خطورة مثل الغرغرينا، مما قد يستلزم بتر الاطراف [1].

تعود جذور أستعمال النباتات في مجال الطب الى الحضارات العريقة، حيث كانت النباتات هي الاساس في علاجات الطب الشعبي الخاص بالصين و الهند ومصر القديمة. ومع تقدم التقنيات الطبية، تم عمل العديد من الأبحاث حول الخصائص الطبية لتلك النباتات مما أدى الى فهم عميق الى المركبات الفعالة وتقييمها بشكل علمي في يومنا هذا.

لاتزال النباتات الطبية تحظى بدور هام داخل مجال الطب التكميلي والبديل، وتعتبر من الخيارات المعتمده لتعزيز الصحة ومقاومة الامراض. تستمر الأبحاث بهدف اكتشاف المزيد من النباتات وخصائصها الفعالة و الوصول لطرق جديدة قد تثبت فعاليتها ضد الامراض الصعبة. بالرغم من امكانات المضادات الحيوية التي ظهرت في القرن الماضي وانتشار استخدامها على نطاق واسع، إلا ان الاستخدام المحدود لهذه المضادات والمخاطر المرتبطة بأثارها الجانبية وظهور مقاومة البكتيريا لبعضها قاد الى اعادة التقييم لأهمية النباتات الطبية كمورد لا غنى عنه في صناعة الدواء [2].

تستمر معظم البكتيريا بتطوير مقاومتها معقدة بذلك مهمة إيجاد علاجات للأمراض الناجمة عنها وعلاوة على ذلك يسهم استخدام مضادات حيوية جديدة في تنامي مقاومة البكتيريا، مما يؤدي بمرور الوقت إلى تفاقم المشكلة الصحية، ولهذا السبب تبرز الحاجة للبحث عن نباتات طبية ذات تأثير مثبط أو قاتل للبكتيريا [3،4].

زيت حبة البركة المعروف أيضا بزيت الحبة السوداء مستخرج من بذورنبات *Nigella sativa*، وقد استخدم في الطب الشعبي لعلاج مجموعة متنوعة من الأمراض. الأبحاث أشارت إلى أن زيت حبة البركة يمتلك خصائص مضادة للبكتيريا مما يجعله موضوعا للاهتمام في علاج التهابات [5-7].

تحتوي حبة البركة على مركب نشط يدعى Thymoquinone والذي أظهر فعالية في مكافحة أنواع متعددة من البكتيريا. هذا المركب يعمل عن طريق تعطيل الأغشية الخلوية للبكتيريا، مما يؤدي إلى موتها ومنع انتشار العدوى. يمكن أن يساعد استخدام زيت البركة في تقليل الحمل البكتيري في التهابات قدم السكري وتسريع عملية الشفاء. زيت حبة البركة أظهر نشاطا مضادا ضد مجموعة واسعة من البكتيريا المسببة للعدوى في قرحات القدم السكري مما يعزز من إمكانيته استخدامه كعلاج تكميلي [7]. تهدف الدراسة إلى عزل وتعريف البكتيريا المصاحبة للقدم السكري واختبار حساسيها للمضادات الحيوية وتقيم مدى فعالية زيت حبة البركة عليها.

المواد وطرائق العمل:

جمع العينات وزراعتها:

جمعت 40 مسحة من جروح ملتهبة في حالات القدم السكري لمترددين على مستشفى الحكمة التخصصي بمدينة مصراتة، ومن كلا الجنسين و بفئات عمرية مختلفة، وذلك بإمرار الماسح القطني

(Cotton swab) على اسطح الجروح و الأنسجة المصابة لحالات القدم السكري، ثم زرعت بطريقة التخطيط على طبق حاوي على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar وحضنت الأطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة. نقلت المستعمرات الى الوسط المغذي الصلب المائل لغرض التنقية واجراء الفحوصات التشخيصية [8].

الفحوصات التشخصية:

شملت الدراسة الصفات الظاهرية للمستعمرات النامية على الا وساط الزراعية Blood agar و Mannitol agar و MacConkey agar ، و تم معاملة العزلات البكتيرية بصبغة جرام ووصفها باستخدام الصبغة التفاعلية [9]. بالاضلفة الى اجراء اختبار الكاتاليز لتمييز المكورات العنقودية عن المكورات السبحيه، واختبار افراز أنزيم Coagulase لتمييز المكورات العنقودية الذهبية الممرضة [10]. ولتعريف البكتيريا السالبة لصبغة جرام اجري اختبار EPI 20E.

حفظ العزلات:

بعد التعريف المبدئي على العزلات البكتيريا حفظت في Nutrient broth يحتوي علي 20% v/v من الجليسيرول (Glycerol) عند درجة حرارة -20 م الي حين الاستخدام [11].

اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية:

لاختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية استخدمت طريقة انتشار الأقراص [11]. والمضادات الحيوية المستخدة هي Amikacin, Augmentin, Piperacillin, Cefotaxime, Ceftazidime, Cefuroxime, Ceftriaxone, Imipenem, Azithromycin, Erythromycin, Ciprofloxacin, Tetracycline, Vancomycin, Gentamicin.

نقلت مستعمرات بكتيرية من كل نوع الى أنابيب المحلول المتعادل (Normal saline) وذلك لغرض الحصول على معلق بكتيري عكارتة مساوية لمحلول ماكفرلاند 5% المستعمل في اجراء اختبار الفعالية البيولوجية. نشر 0,1 مل من المعلق على وسط اختبار الحساسية (Muller-Hinton agar). وزع على كامل الطبق. ترك دقائق ليمتصه الوسط. نقلت اقراص المضادات الحيوية المختبرة على الوسط بواسطة ملقط معقم. حضنت الاطباق على درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.

تأثير زيت حبة البركة على العزلات البكتيرية:

. نشر 0,1 مل من المعلق على وسط اختبار الحساسية (Muller-Hinton agar) بالطريقة السابقة. نقلت أقراص ورق الترشيح (قطرها حوالي 6 مم) مشبعة بزيت حبة البركة الى الاطباق الملقحة بالبكتيريا المعزولة، بالاضافة الى هذه الأقراص نقل قرص من المضاد الحيوي Ciprofloxacin كمرجع، وقرص آخر مشبع بالماء المقطرالمعقم كشاهد.

النتائج والمناقشة:

أجريت الدراسة على 40 مسحة اخذت من مترددين على عيادات مستشفى الحكمة مصراتة مصابين بتقرحات القدم السكري. شملت الدراسة ذكور بعدد 28 (70%) واناث بعدد 12 (30%).

عزلت منها 33 عزلة بكتيرية واظهرت الدراسة ان اعلى نسبة تواجد كان للبكتيريا الموجبة لصبغة جرام *Staphylococcus aureus* بعدد 16 عزلة (48.5%) و التواجد العالي لهذا النوع من البكتيريا يتوافق مع الدراسة التي اجراها كلا من [7، 12،13]. فيما اختلفت مع ما توصلت اليه الدراسة التي اجراها كلا من [12،14] حيث بلغت 6% و 14.7% على التوالي. وتم الحصول على 5 عزلات (15.15%) لكل من *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*، وتواجدت بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* بعدد 4 عزلات (12.1%) ، بالإضافة الى عزلتان من بكتيريا *Enterococcus faecalis* (6.1%) و عزلة (3%) لبكتيريا *Streptococcus pyogenes* (جدول 1). وفيما توافقت نسبة تواجد بكتيريا *Escherichia coli* و بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* بالإضافة الى بكتيريا *Enterococcus faecalis* مع ما توصلت اليه الدراسة التي اجراها [14]، كان تواجد بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterococcus faecalis* اعلى بنسبة 19.6%، 11.8% على التوالي بنفس الدراسة.

جدول 1: الانواع البكتيرية المعزولة:

البكتيريا	العدد	النسبة (%)
موجبة لصبغة جرام	19	57.6
Staph. aureus	16	48.5
S. pyogenes	1	3
E. faecalis	2	6.1
سالبة لصبغة جرام	14	42.4
P. aeruginosa	5	15.15
E. coli	5	15.15
K. pneumoniae	4	12.1

حساسية المضادات الحيوية:

لتحديد اختبار حساسية البكتيريا المعزولة للمضادات لحيوية تم اختيار 33 عزلة بكتيرية شملت 19 عزلة من البكتيريا الموجبة لصبغة جرام منها 16 عزلة لبكتيريا *Staph. aureus* و عزلة واحدة من بكتيريا *S. pyogenes* و عزلتان من بكتيريا *E. faecalis*، بالاضافة الى 14 عزلة من الكتيريا السالبة لصبغة جرام منها 5 عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* و 5 عزلات لبكتيريا *E. coli* بالاضافة الى 4 عزلات من بكتيريا *K. pneumoniae*.

أظهرت الانواع البكتيرية الموجبة لصبغة جرام التابعة لجنس Staphylococcus اعلى حساسية للمضادات الحيوية Imipenem و Vancomycin بنسبة 93.7% لكل منهما، يليها المضاد الحيوية Cefotaxime (87.5%) والمضادات الحيوية Azithromycin وTetracycline وGentamicin بنسبة تاثير 62.5% لكل منهما. وبلغ تاثير المضادان Amikacin و Ceftriaxone نسبة 56.3%، فيما كان للمضاد Augmentin تاثير 50% فقط على الأنواع البكتيرية المعزولة من هذا الجنس، اما بقية المضادات كان لها تاثير اقل من 44%.

أظهرت بكتيريا *S. pyogenes* مقاومة للمضادات الحيوية Amikacin وAugmentin وCiprofloxacin، فيما كانت حساسة لبقية المضادات المستخدمة في الدراسة بنسبة 100%. واوضحت الدراسة ان بكتيريا *E. faecalis* كانت لها مقاومة للمضادات الحيوية Amikacin و Ceftazidime و Ciprofloxacin و Tetracycline بنسبة 100%، وكانت احدى العزلات لهذا الجنس مقاومة للمضادات Azithromycin و Cefotaxime و Ceftriaxone، فيما كانت جميعها حساسة لبقية المضادات المستخدمة في الدراسة بنسبة 100% (جدول 2). أوضحت الدراسة ان ثلاث عزلات من بكتيريا *P. aeruginosa*

كانت مقاومة للمضادات الحيوية Ceftazidime و Ciprofloxacin و Ceftriaxone و Tetracycline و Erythromycin، و عزلتان كانتا مقاومة للمضادات Amikacin و Imipenem و Vancomycin، فيما كانت جميعها مقاومة لبقية المضادات المستخدمة في الدراسة بنسبة 100. بكتيريا *E. coli* كانت ثلاث عزلات منها حساسة للمضادات Augmentin و Azithromycin و Cefotaxime و Ceftazidime و Cefuroxime و Tetracycline، وعزلتان كانتا حساسة للمضادات Ciprofloxacin و Imipenem وVancomycin و Cefotaxime، فيما كانت مقاومة لبقية المضادات المستخدمة في الدراسة بنسبة 100%. اما بكتيريا *K. pneumoniae* فكانت جميعها مقاومة للمضادات Azithromycin و Cefotaxime وCeftazidime، وفيما كانت عزلتان مقاومة للمضادات Amikacin و Imipenem و Piperacillin، أوضحت الدراسة ان عزلة واحدة من هذا الجنس كانت حساة لبقية المضادات المستخدمة (جدول 3).

جدول 2: حساسية البكتيريا المعزولة الموجبة لصبغة جرام للمضادات الحيوية:

E. faecalis				*S. pyogenes*				*Staph. aureus*				المضاد الحيوي
R		S		R		S		R		S		
%	ع	%	ع	%	ع	%	ع	%	ع	%	ع	
00	0	100	2	100	1	0	0	43.75	7	56.25	9	Amikacin
100	2	00	0	100	1	00	0	50	8	50	8	Augmentin
50	1	50	1	00	0	100	1	37.5	6	62.5	10	Azithromycin
50	1	50	1	00	0	100	1	12.5	2	87.5	14	Cefotaxime
100	2	00	0	00	0	100	1	68.75	11	31.25	5	Ceftazidime
00	0	100	2	00	0	100	1	18.75	3	81.25	13	Cefuroxime
100	2	00	0	100	1	00	0	56.25	9	43.75	7	Ciprofloxacin
00	0	100	2	00	0	100	1	6.25	1	93.75	15	Imipenem
00	0	100	2	00	0	100	1	68.75	11	31.25	5	Piperacillin
50	1	50	1	00	0	100	1	43.75	7	56.25	9	Ceftriaxone
100	2	00	0	00	0	100	1	37.5	6	62.5	10	Tetracycline
00	0	100	2	00	0	100	1	56.25	9	43.75	7	Erythromycin
00	0	100	2	00	0	100	1	6.25	1	93.75	15	Vancomycin
00	0	100	2	00	0	100	1	37.5	6	62.5	10	Gentamicin

جدول 3: حساسية البكتيريا المعزولة السالبة لصبغة جرام للمضادات الحيوية:

K. pneumoniae				*E. coli*				*P. aeruginosa*				المضاد الحيوي
R		S		R		S		R		S		
%	ع	%	ع	%	ع	%	ع	%	ع	%	ع	
50	2	50	2	100	5	00	0	60	3	40	2	Amikacin
75	3	25	1	40	2	60	3	100	5	00	0	Augmentin
100	4	00	0	40	2	60	3	100	5	00	0	Azithromycin
100	4	00	0	40	2	60	3	100	5	00	0	Cefotaxime
100	4	00	0	40	2	60	3	40	2	60	3	Ceftazidime
75	3	25	1	40	2	60	3	100	5	00	0	Cefuroxime
75	3	25	1	60	3	40	2	40	2	60	3	Ciprofloxacin
50	2	50	2	60	3	40	2	60	3	40	2	Imipenem
50	2	50	2	100	5	00	0	100	5	00	0	Piperacillin
75	3	25	1	100	5	00	0	40	2	60	3	Ceftriaxone
75	3	25	1	40	2	60	3	40	2	60	3	Tetracycline
75	3	25	1	100	5	00	0	40	2	60	3	Erythromycin
75	3	25	1	60	3	40	2	60	3	40	2	Vancomycin
75	3	25	1	100	5	00	0	100	5	00	0	Gentamicin

تأثير زيت حبة البركة على العزلات البكتيرية:

اظهرت نتائج الدراسة ان زيت حبة البركة كان له تأثير تثبيطي على نوعين من البكتيريا المعزولة هما *Staph. aureus* و *P. aeruginosa*. واظهرت بكتيريا *P. aeruginosa* أعلي حساسية للزيت بمتوسط قطر 16ملم، بينما كان التأثير التثبيطي أقل على بكتيريا *Staph. aureus* بمتوسط قطر 12ملم (جدول 4)، وهو ما يتفق مع دراسة [15، 16]. ولم يلاحظ تاثير تثبيطي لزيت حبة البركة على بقية العزلات. وصلت نسبة التثبيط للمستخلص العضوي لحبة البركة على بكتيريا *Staph. aureus* 100% عند التركيز 3.6% [17]. كما أظهرت دراسة اجراها [18] باستخدام مستخلص زيت حبة البركة بواسطة جلايكول الإثيلين (Ethylene glycol) قدرة تثبيطية اعلى مما توصلت الية الدراسة الحالية على بكتيريا *Staph. aureus* و *P. aeruginosa* حيث بلغت 48 ملم و 25 ملم

على التوالي، وقد يرجع السبب الى قدرة المذيب العضوي المستخدم كونة مذيب جيد وله قدرة على الذوبان في الماء والمذيبات العضوية. وصل القطر التثبيطي لمستخلص حبة البركة بواسطة الميثانول (Methanol) عند التركيز 100% على بكتيريا *Staph. aureus* و *P. aeruginosa* الى 12 ملم و 19 ملم على التوالي، فيما كان القطر التثبيطي لمستخلص حبة البركة بواسطة الأثير البترولي (Petroleum ether) 10 ملم عند نفس التركيز على بكتيريا *Staph. aureus* و *P. aeruginosa* [19]. اثبتت الدراسة التي قام بها [17] قدرة المستخلص العضوي لحبة البركة على تثبيط بكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 100% عند التراكيز 10%. وقد يرجع هذا الاختلاف في القدرة التثبيطية لمستخلص حبة البركة على نوع المذيبات المستخدمة في الاستخلاص.

وعلى العكس من الدراسة الحالية بعدم وجود تاثير لزيت حبة البركة على بعض الأنواع البكتيرية المختبرة (*S. pyogenes*، *E. faecali*، *E. coli*، *K. pneumoniae*) فقد اظهرت الدراسة التي قام بها [17] قدرة المستخلص العضوي لحبة البركة على تثبيط بكتيريا *E. coli* بنسبة 100% عند التراكيز 1.5%. فيما لاحظ [20]. نتيجة إيجابية لمستخلص الميثانول من حبة البركة بتركيز 20 ملغم/مل ضد بكتيريا *Streptococcus pyogenes* وصلت الى 19ملم، كما سجل المستخلص نشاط مماثل على بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* بلغت منطقة التثبيط له 15 ملم، فيما كان ايضا للمستخلص المائي لحبة البركة تأثير ملحوظ ومختلف عن المستخلص الميثانولي تجاه هذين النوعين من البكتيريا بلغ فيه القطر التثبيطي على بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* و *Streptococcus pyogenes* 20 ملم و 15 على التوالي، وهي اعلى على النوعين مقارنة بالاستخلاص الميثانولي. كما بلغ القطر التثبيطي للمستخلص الميثانولي الخام لحبة البركة بتركيز 100% على بكتيريا *Enterococcus faecalis* 16.8 ملم [21].

جدول 4: تأثير زيت حبة البركة (100%) على العزلات البكتيرية:

البكتيريا المستخدمة	المكررات (ملم)			المتوسط (ملم)
	1	2	3	
Staph. aureus	13	11	12	12
S. pyogenes	0	0	0	0
E. faecalis	0	0	0	0
P. aeruginosa	15	18	14	16
E. coli	0	0	0	0
K. pneumoniae	0	0	0	0

المراجع

1. Smith, J. (2020). Bacterial infections in Diabetic foot Ulcers: Microbial Diversity and Clinical Implications. Journal of Diabetes Research. 35-50.
2. 2. Abdulsahib, E., Ibrahim, A., Hussein, A. & Marzuog, K. (2019). The effect of *Nigella sativa* and other plants on bacteria isolated from diabetic foot ulcers,11: 2434 – 2439.
3. Mahal, S., Hadi, Z. & Khalid, R. (2020). Impact study of *Nigella sativa* Extract on some virulence factor of Staphylococcus *aureus* bacteria which isolate from the Clinical Specimen. Systematic Reviews in Pharmacy. 11(4): 471 475.
4. Oskouei, Z., Akaberi, M., Hosseinzadeh, H. (2018): A glance at black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone, in ischema a review, Ira, J, Basic Med, Sci, 21: 1200 – 1209.
5. Hanafy, M., S., M., & Hatem, M. E. (1991). Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). Journal of Ethnopharmacology ,34 (2) 275-278.
6. Hannan, A., Saleem, S., Chaudhary, S., Barkaat, M., & Arshad, M., U. (2008). Antibacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus.* J Ayub Med Coll Abbottabad,34 (3),72-74.
7. Ahamed, A., A., M., Gharib, A., A., Elshorbgy, I., Elewasy, O., A., & Elmowalid, G., A. (2022). *Nigella sativa* oil extract: A natural novel specific conjugal transfer inhibitor of vancomycin resistance from van A/B-resistant *Enterococcus faecium* to *Staphylococcus aureus*, Journal of Applied Microbiology ,133(2) 619-629.
8. Russell, F., Biribo, S., Selvaraj, G., Oppedisano, F., Warren, S., Seduadua, A. and Carapeetis, J. (2006). As a bacterial culture medium, citrated sheep blood agar is a practical alternative to citrated human blood agar in laboratories of developing countries. *Journal clinical microbiology.* 3346-3351.
9. Bergey, D.H. 's Manual of Determinative Bacteriology. American Society for Microbiology .1860-1937, Breed 1957.

10. Madigan, M.T.; Martinko J.; Parker J. (2004). Brock Biology of Microorganisms (10th ed.). Lippincott Williams & Wilkin.
11. Lapage S. P., Shelton J. E. and Mitchell T. G. (1970) ` in Methods in Microbiology Eds. Norris J. R. and Ribbons D. W. Vol.3A. Academic Press. London. p.116.
12. Hadi, P., Rampal, S., Neela, V., K.., Cheema, M., S., Sarawan Singh, S., S., Kee Tan, E., Sinniah, A. (2023). Distribution of Causative Microorganisms in Diabetic Foot Infections: A Ten-Year Retrospective Study in a Tertiary Care Hospital in Central Malaysia. Antibiotics. (12) 1-11.
13. Al-Ameedy, T., H., and Omran, R. (2019). Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* Extract Against some Bacterial and Fungal Species. Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences. 27(1) 277-286.
14. Chai W, Wang Y, Zheng H, Yue S, Liu Y, Wu Y and Li X (2021) The Profile of Microbiological Pathogens in Diabetic Foot Ulcers. Front. Med. 8: 1-8.
15. Kamal, A., Arif, J., M., and Ahmad, I., Z. (2010). Potential of *Nigella sativa* L. seed during different phases of germination on inhibition of bacterial growth. J. Biotechnol. Pharm. Res,1 (1) 9-13.
16. Zuridah, H., Fairuz, A.R.M., Zkari, A.H.Z and Rahim, M.N.A. (2008). Invitro antibacterial activity of Nigella sativa against Staphylococcus *aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Klebsiella *pneumoneia*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. Asian J. plant. Sci. 7 (3): 531 – 333.
17. Abu alqasim Iman, Zohor Alblbali1, Zahwa Othman1, Omar M.Abukhres, Ibrahim A . Mokhtar, and Ali F. Hawad. The study of effect of *Lepidium sativum* and *Nigella sativa* on the growth of number of Gram negative and Gram-positive bacteria. Journal of Pure & Applied Sciences. 15 (5) 1-6.
18. Salman, M.T., Khan, R.A. and Shukla, I. (2008). Antimicrobial activity of *Nigella sativa* Linn. Seed oil against multi-drug resistance bacteria from clinical isolates. Natural product radiance 7 (1) 10-14.
19. Usman, R.A., Idris, M.M. and Makinde, S.A. (2017). Antimicrobial activities of *Nigella sativa* seed extracts. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences: 10 (1): 328 – 330.
20. Nor' Aishah H.asan, Mohd. Zaini Nawahwi and Haslinda Ab malek. (2013). Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* Seed Extract. Sains Malaysiana 42 (2): 143–147.
21. Myrna Nurlatifah Zakaria, Yusfien Shabrina Putri, Asih Rahaju, Sri Fatmawati and Arief Cahyanto (2021). Inhibitory effect of calcium hydroxide combined with *Nigella sativa* against *Enterococcus faecalis.* Dental Journal. 54 (4): 181–185.