

Effect of Ascorbic acid on the sensitivity of *Salmonella typhi* to antibiotics

Muhsin A. Essa

Department of Biology

College of Science

University of Mosul

muhsbio13@uomosul.edu.iq

Bushra D. Hamad

Department of Biology

College of Education

University of Mosul

Dhuha J. Mohamed

Department of Biology

College of Education

University of Mosul

Received

10/02/2013

Accepted

08/05/2013

Keyword: *S.typhi*, Ascorbic acid, Vitamin C.

Abstract

This study included the investigation of the effect of Ascorbic acid (Vitamin C) and incubation at temperature of 44 C° on the sensitivity of *Salmonella typhi* to some antibiotics to which resistant it was Resistant Results showed that Ascorbic acid had a curing impact in removal of resistance character against many antibiotics (Amikacin Erythromycin ,Tobramycin, Penicillin). Concentration of Ascorbic acid had a role in its effectiveness and the concentration (1.5) mM was the best in all curing results. The study also demonstrated that the temperature 44c° had a curing effect on the resistance of bacteria under to most studied antibiotics except erythromycin according to this results and because Ascorbic acid is not toxic, it be used with antibiotics against infection with *Salmonella typhi* .

تأثير حامض الأسكوربيك في حساسية بكتريا *Salmonella typhi* تجاه المضادات الحيوية

ضحى جاسم محمد	بشرى دلي حمد	محسن ايوب عيسى
قسم علوم الحياة	قسم علوم الحياة	قسم علوم الحياة
كلية التربية / جامعة الموصل	كلية التربية / جامعة الموصل	كلية العلوم / جامعة الموصل
تاريخ القبول	تاريخ الاستلام	
2013/05/08	2013/02/10	

الكلمات المفتاحية: بكتريا السالمونيلا، حامض الأسكوربيك، فيتامين سي.

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية توضيح تأثير حامض الاسكوربيك Ascorbic acid (فيتامين C) والتحصين بدرجة حرارة 44م في حساسية بكتريا *Salmonell typhi* تجاه عدد من المضادات الحيوية المقاومة لها, وظهرت النتائج ان حامض الاسكوربيك كان له تأثيراً في تحييد وازالة صفة المقاومة تجاه عدد من المضادات الحيوية (Amikacin و Tobramycin , Erythromycin , Penicillin) وكان لتركيز الحامض دورا في تأثيره وان التركيز (1.5) ملي مولاري كان ملائما لجميع نتائج التحييد, وبينت نتائج الدراسة ان درجة الحرارة 44م كان لها تأثير محيد في مقاومة معظم المضادات الحيوية المدروسة عدا المضاد Erythromycin . واستنادا الى هذه النتائج ولكون حامض الاسكوربيك مركب غير سام تم الاستنتاج بإمكانية استخدامه كعلاج مشترك تجاه الاصابة ببجرثومة *S. typhi* .

المقدمة

أصبحت مشكلة مقاومة البكتيريا للأنواع المختلفة من المضادات الحيوية من المشكلات العالمية المهمة حيث تقوم هذه الجراثيم باستمرار بتطوير آليات مقاومتها وأكثرها شيوعا هو إنتاج أنزيمات معينة تعمل على إحداث تغيير في تركيب المضاد وبالتالي تحلله فمثلا أنزيمات β -lactamases التي تحلل البتا لاكتام β -lactam لبعض البنسلينات والسفالوسبورينات وكذلك انزيم chloramphenicol acetyl transferase الذي يعمل على إبطال مفعول المضاد الكلورامفينيكول chloramphenicol [1]. وغيرها من المضادات وبالتالي تفقدها الفائدة العلاجية ولذلك أصبح علاج العديد من الأمراض أمرا في غاية الصعوبة بالإضافة إلى أن الاستخدام المفرط لهذه المضادات له آثار سلبية جانبية على الصحة [2], لهذا السبب فالدراسات مستمرة في استخدام كافة الوسائل للتخلص من مقاومتها للمضادات الحيوية مثل درجة الحرارة والاس الهائيدروجيني واستخدام المعادن الثقيلة و زمن التحضين وكذلك استخدام مواد كيميائية مختلفة وغيرها [3] .

تعود مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية إلى امتلاكها جينات معينة عادة تكون موجودة على البلازميد Plasmid والذي هو عبارة عن قطع دائرية من DNA مزدوجة لها القدرة على التضاعف خارج كروموسوم الخلية البكتيرية لذا فهي عوامل وراثية مهمة في الخلية البكتيرية تكسبها القدرة على إنتاج ذيفانات خارجية Exotoxins والهيموليسين Haemolysin وإنتاج مستضدات الالتصاق Adhesive antigens ومقاومة المضادات الحيوية وإنتاجها, إضافة إلى العديد من الوظائف الأخرى المهمة للبكتيريا [4].

وتعد بكتيريا *S.typhi* المسببة للحمى التايفوئيدية والتي تعود للعائلة المعوية *Enterobacteriaceae* هي من الجراثيم المهمة التي تنتشر بصورة وبائية عالميا ومحليا والتي طورت مقاومتها للعلاجات بصورة واضحة [5,6,7].

فيتامين C يعد من الفيتامينات المهمة جدا للصحة حيث انه يقوي المناعة وعادة يؤخذ في حالات الأنفلونزا والإصابات الفيروسية, وهو مركب متوفر وامن ومعروف علميا باسم حامض الاسكوريك Ascorbic acid وهو عامل مختزل ولهذا فهو مطلوب لحفظ المعادن في الحالة المختزلة مثل الحديد والنحاس و يعزز امتصاص الحديد عن طريق إبقائه في الحالة المختزلة وهو مطلوب أيضا لإضافة مجموعة الهيدروكسيل إلى إنزيم hydroxylase أثناء عملية صنع الكولاجين ,ومطلوب أيضا لهدم الحامض الاميني تايروسين tyrosine أثناء تصنيع هرمون الأدرنالين, الصيغة الجزيئية لحامض الاسكوريك هي $C_6H_8O_6$ وزنها الجزيئي 176.13 وهو عبارة عن مسحوق ابيض ثابت نوعا ما في الأوساط الجافة , لكنه يتأكسد بسرعة في المحاليل ويتحلل بسهولة في الماء و الكحول وعديم التحلل في الكلوروفورم والأيثر والبنزين. ويستخدم في طرق الحفظ ضد الفساد الجرثومي للأغذية .

يستخدم حامض الاسكوريك لعلاج بعض الامراض كمرض الاسقربوط ويستخدم كمضاد للأكسدة ويقلل من الاصابة بالعديد من الاحياء المجهرية الممرضة, ويقوي الجهاز المناعي وكريات الدم البيض , ويختزل البكتيريا الممرضة في البيئات الحامضية حيث ان استخدام تركيز 2.5غم من حامض الاسكوريك يخفض pH الادرار الى 5.5 ويعد حامض الاسكوريك احد العوامل المحيدة للبكتيريا في مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية واعطاء صفة المقاومة تجاه المضادات الحيوية [8] .

وقد اجري هذا البحث بهدف دراسة قابلية حامض الاسكوربيك في تحييد وازالة صفة المقاومة للعلاجات في جرثومة *S. typhi* ومقارنة ذلك مع تاثير درجة الحرارة العالية 44م.

المواد وطرائق العمل

1-المواد

1-1البكتريا المستخدمة في الدراسة

استخدمت بكتريا *S.typhi* المعزولة والمشخصة في قسم علوم الحياة / كلية العلوم جامعة الموصل. من عينات دم المرضى المشكوك بإصابتهم بالحمى التايفوئيدية ممن راجعوا مختبرات مستشفيات الشفاء وابن سينا والكمالية والسلام والعام في محافظة نينوى فضلا عن المختبرات الأهلية التي اختيرت من داخل مركز المحافظة وخارجه وكانت العينات تمثل كلا الجنسين والأعمار كافة [2].

2-1 حامض الاسكوربيك Ascorbic acid

تم الحصول على حامض الاسكوربيك بصورة نقية والمجهز من الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية سامراء-العراق.

3-1 اقراص المضادات الحيوية

استخدمت اقراص المضادات الحيوية في الجدول (1) والمجهزة من شركة Bioanalyse LTD Ankara Turkey لغرض بيان حساسية البكتريا قيد الدراسة.

جدول (1) المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة.

المضاد الحيوي	المختصر	التراكيز (مايكروغرام/قرص)
Erythromycin	E	15
Vancomycin	VA	10
Streptomycin	S	10
Penicillin	P	10
Gentamicin	CN	10
Amoxicillin+Clavanic acid	C	10
Trimethoprim	TMP	10
Amoxicillin	AX	25
Trimethoprim+Sulphamethoxazole	SXT	25
Ampicillin	AM	10
Rifampin	RA	5
Doxycycline	TE	10
Clindomycin	DA	10
Amikacin	AK	10
Tobramycin	TOB	10

2- طرائق العمل

2-1 اختبار الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية قبل المعاملة:-

اختبرت الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية على نمو بكتريا *S. typhi* قيد الدراسة باستخدام طريقة اختبار الحساسية (طريقة الانتشار بالأقراص) وبالاعتماد على طريقة Bauer وجماعته سنة 1966 [9] حيث حضر المعلق البكتيري باستخدام انايبب حاوية لمحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline وقورنت كثافة المعلق الجرثومي بانبوبة ماكفرلند القياسية Macfarland Standards No.1 للحصول على تركيز الخلايا (108) خلية / سم³ , نقل 0.1سم³ من المعلق البكتيري ولقح باستخدام ماسحة قطنية معقمة على وسط الأكار المغذي ثم حضنت الإطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 30 دقيقة لكي يحصل التشرب. بعد ذلك ثبتت اقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم على سطح الاطباق الملحقة وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء فترة التحضين تم قياس أقطار التثبيط حول الاقراص.

2-2 اختبار تأثير تراكيز حامض الاسكوريك على حساسية البكتريا المدروسة تجاه المضادات الحيوية المقاومة لها:

حضر 25 مل من المحلول القياسي Stock Solution لحامض الاسكوريك وذلك بوزن 0.022غم من مسحوق الحامض وذوب في 25 مل من الماء المقطر المعقم بأس هيدروجيني (7.2) للحصول على التركيز 5 ملي مولار/ لتر من الحامض , حيث اخذت الحجم التالي (0.1 و 0.25 و 0.5 و 1 و 1.5 و 2) مل من المحلول القياسي كل على حدة ووضعت في فيالات نظيفة ومعقمة, وتحت ظروف تعقيم صارمه اكملت الحجم باستخدام المرق المغذي المعقم الى 5 مل حيث كانت حجوم المرق المغذي المضافة (4.9 , 4.75 , 4.5 , 4 , 3.5 , 3) مل على التوالي للحصول على التراكيز (0.1 و 0.25 و 0.5 و 1 و 1.5 و 2) ملي مولار / لتر واستنادا الى [10] .

بعد ذلك لقحت هذه التراكيز بـ 0.1 مل من مزرعة البكتريا بعمر 24 ساعة كما لقح 5 مل من المرق المغذي كعينة سيطرة وحضنت بدرجة حراره 37 م لمدة 24 ساعة , بعد انتهاء فترة التحضين اخذ 0.1 مل من النمو الناتج بالتراكيز المختلفة من حامض الاسكوريك كل على حدة و نشرت على سطح الاكار المغذي باستخدام الماسحة القطنية وتركت الاطباق لتتشرب لمدة 30 دقيقة بعدها وضعت اقراص المضادات الحيوية وحضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة وقيست مناطق التثبيط.

2-3 تأثير النمو في درجة الحرارة 44 م على حساسية البكتريا المدروسة تجاه المضادات الحيوية المقاومة لها:

لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بمستعمرة مفردة من جرثومة *S. typhi* وحضنت المزرعة الجرثومية لمدة 24 ساعة عند درجة حراره 37 م . بعد انتهاء فترة التحضين اخذ 0.1 مل من المزرعة الجرثومية ولقح بها 5 مل من وسط المرق المغذي وحضن الوسط الغذائي الملقح لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 44 م فضلا عن ذلك تم اخذ 0.1 مل من المزرعة الجرثومية (المزرعة الاصلية) واضيف الى 5 مل من وسط المرق المغذي وحضنت المزرعة لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م لاستخدامه كنموذج سيطرة لملاحظة التحييد التلقائي [11].

بعد انتهاء فترة التحضين اخذوا 0.1 مل من المزرعة الفتية ونشرت على سطح الاكار المغذي باستخدام المساحة القطنية وتركت الاطباق لتتسرب لمدة 30 دقيقة بعدها وضعت اقراص المضادات الحيوية و حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وقيست مناطق التثبيط.

النتائج والمناقشة

اجرى اختبار الحساسية لبكتريا *S. typhi* تجاه المضادات الحيوية لغرض مقارنة تأثير بعض المضادات الحيوية المتداولة قبل وبعد معاملة بكتريا *S. typhi* كما موضح في الجدول (2)، حيث يتضح مقاومة هذه البكتريا لسبعة انواع من المضادات المدروسة الموضحة في جدول (1) حيث ازدادت مؤخرًا انماط المقاومة فيها تجاه العديد من المضادات من خلال تطويرها آليات مقاومة للمضادات بامتلاكها آليات تحول المواد المضادة للبكتريا الى مركبات غير سامة، فضلا عن انتقال الجينات المسؤولة عن مقاومة البكتيريا ضد المضاد الحيوي من خلية إلى أخرى، وهي خاصية شائعة في البكتيريا وليست موجودة في الكائنات الأخرى [14,13,12].

جدول (2) حساسية بكتريا *S. typhi* قبل المعاملة تجاه بعض المضادات الحيوية.

اسم المضاد الحيوي	نمط الحساسية
Erythromycin	R
Vancomycin	R
Streptomycin	S
Penicillin	R
Gentamicin	R
Amoxicillin+Clavanic acid	S
Trimethoprim	S
Amoxicillin	S
Trimethoprim+Sulphamethoxazole	S
Ampicillin	S
Rifampin	S
Doxycycline	R
Clindomycin	S
Amikacin	R
Tobramycin	R

استخدمت المضادات الحيوية السبعة المقاومة لها في التجارب اللاحقة لبيان قابلية حامض الاسكوريك في ازالة او تحييد صفة المقاومة لهذه المضادات حيث يتضح من الجدول (3) ان التراكيز (0.5 و 1 و 1.5 و 2) ملي مولاري لحامض الاسكوريك اظهرت تأثيرا محييدا لبكتريا *S. typhi* ضد اربعة انواع من المضادات الحيوية قيد الدراسة وهي Erythromycin, Penicillin, Amikacin و Tobamycin مما يؤكد قابلية التحييد التي يمتلكها هذا المركب والتي درست في جراثيم اخرى منها *Pediococcus acidilactics* [15] *Sarratia marcesnces* [17] *Pseudomonas aeruginosa* [16] *Staphylococcus aureus* [18] وان هذه الفعالية المحييدة لحامض الاسكوريك قد تكون ناتجة عن التحورات في خصائص ال DNA كما انه يعمل على اكسدة الدهون المكونة للغشاء البلازمي وتثبيط العديد من الفعاليات الحيوية ويؤثر على عملية

استنساخ البلازميدات [19] وان هذه التأثيرات المختلفة هي التي تساهم بطريقة او باخرى في ازالة صفة المقاومة تجاه المضادات ذات الليات العمل المختلفة .

كما يلاحظ من النتائج في الجدول (3) ان تركيز الحامض له دور في التأثير ففي حالة كل من Amikacin و Penicillin بدأ التأثير مع التركيز الاول (0.1) ملي مولار ثم ازداد مع زيادة التركيز اما في حالة المضادين Erythromycin و Tobamycin فقد بدأ التأثير مع التركيز (0.5) ملي مولار ويبدو ان التأثير قد يستقر في التركيز (1.5) ملي مولار الذي يعد التركيز الامثل لكافة المضادات المتاثرة . ان عدم تآثر بقية المضادات بتركيز الحامض المختلفة ربما يعود الى عدم وقوع جينات المقاومة على البلازميدات او عدم تآثر الليات المقاومة تجاه هذه المضادات .

واذا ما اخذنا بنظر الاعتبار ان حامض الاسكوريك مادة غير سامة (فيتامين C) فبالامكان استخدامها بصورة مشتركة مع المضادات الحيوية التي قد تكون الجراثيم مقاومة لها وخاصة في حالة الاصابات المتسببة بجرثومة *S. typhi*.

جدول(3) تأثيرالتركيز المختلفة لحامض الاسكوريك على حساسية البكتريا المدروسة تجاه المضادات الحيوية المقاومة لها(قطر التثبيط بالملم).

تراكيز حامض الاسكوريك						المضادات الحيوية
2 ملي مولاري	1.5 ملي مولاري	1 ملي مولاري	0.5 ملي مولاري	0.25 ملي مولاري	0.1 ملي مولاري	
25	25	20	16	6	6	Erythromycin
6	6	6	6	6	6	Vancomycin
27	25	19	15	12	10	Penicillin
6	6	6	6	6	6	Gentamicin
6	6	6	6	6	6	Doxycycline
30	25	22	9	9	8	Amikacin
20	20	13	8	6	6	Tobramycin

يشير الجدول (4) الى تأثير درجة الحرارة 44 م المستخدمه في مقاومة بكتريا *S. typhi* تجاه المضادات الحيوية قيد الدراسة حيث ادت المعاملة بهذه الدرجة الحرارية الى ازالة صفة المقاومة لمعظم المضادات مما يعكس حساسية الجينات او الاليات المسؤولة عن المقاومة للحرارة [11,1]، وبقية الجرثومة مقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin مما يتفق مع دراسات على جراثيم اخرى تؤكد عدم تآثر مقاومة هذا المضاد بالحرارة *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis* [20] وتستخدم درجة الحرارة العالية بصورة شائعة في اجراء التحييد في الجراثيم فقد توصل [19] الى تحييد بلازميد المقاومة للمضاد الحيوي Kanamycin في جرثومة *Proteus vulgaris* برفع درجة الحرارة الى 42 م وتبين ان تضاعف هذا البلازميد حساس للحرارة وبعد نقل هذا البلازميد بالاقتران الى سلالات لجرثومتي *E.coli* و *Salmonella typhimurium* واستخدمت الحرارة كعامل محيد لهذه السلالات وحصل تحييدا واضحا ضد هذا المضاد.

جدول (4) تأثير النمو في درجة الحرارة 44 م على حساسية البكتريا المدروسة تجاه المضادات الحيوية المقاومة لها (قطر التثبيط بالملم).

المضادات الحيوية	اقطار التثبيط بالملم
Doxycycline	14
Vancomycin	19
Penicillin	15
Gentamicin	22
Erythromycin	6
Amikacin	20
Tobramycin	19

واشار الباحث [21] في دراسة لطبيعة المورثات الخارج كروموسومية لصفات المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة كونها على البلازميدات و اشار الى ان معدل فقدان التلقائي للصفة المدروسة تتأثير بالمواد الكيماوية المحيدة و درجات الحرارة العالية حيث تعمل على زيادة معدل فقدان هذه الصفات.

ان درجات الحرارة المرتفعة تحفز البكتريا على بناء بروتينات الصدمة الحرارية Heat shock proteins وهذه تسمى بالوصيفات Chaperones والتي تستسخ وتترجم استجابة لارتفاع درجة الحرارة وتحمي الخلية الجرثومية من الاذى فتمنع مسخ البروتينات اذ تعمل على طيها فتصبح في حالة مستقرة وظيفيا وحراريا وتعيدها الى الشكل الطبيعي بعد زوال المؤثر [22].

وبالمقارنة مع حامض الاسكوريك كانت الحرارة ذات تاثير اوسع مع ملاحظة تاثير حامض الاسكوريك على المضاد Erythromycin الذي لم يتاثر بالحرارة كما انه من الناحية التطبيقية بالإمكان استخدام حامض الاسكوريك في العلاج المشترك مع المضادات الحيوية.

شكر و عرفان

اتقدم بالشكر الجزيل لجامعة الموصل / كلية التربية للعلوم الصرفة وكلية العلوم متمثلة بالدكتور محسن ايوب عيسى لما بذله من جهد في اكمال هذا البحث.

المصادر

- 1- Al-Khayat, K.H., M.Sc. Thesis, College of Education, University of Mosul (2008). (In Arabic).
- 2- AL-Sabauy B. D. H. M.Sc. Thesis, College of Science, University of Mosul (2005). (In Arabic).
- 3- Farnoosh, A. and Azam H. J Ind Microbiol Biotechnol 33: 238–242, (2006).
- 4- Habeb, Z.S. and Al-Shawi, A.M. Iraqi Medical Journal, Vol. 33, No. (2), (2009).
- 5- Ahmed, K.D. and Aziz, Z.A. Journal of Rafidain Science, Vol. (1), Issue (9). (2006).

- 6- Bailey, W. R. and Scott, E. G. "Diagnostic microbiology a textbook for the isolation and identification of pathogenic microorganisms". The C. V. Mosby Company. London (1974).
- 7- Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. "Bergeys manual of Determinative Bacteriology" 8th ed. Williams and Wilkins Company Baltimore (1974).
- 8- Toledo, I.; Cruz-Vara, L.R.; Sanchez, J.H. and Guarneros, G., J. Bacteria., 182 (6): 1523-1528, (2000).
- 9- Bauer, A., Kirby, W.A., Sherris, J.S., and Turk, M., Am. J. Clin. Pathol., Vol. 45: pp.493-496, (1969).
- 10- Vandepitte, j., Engbac, K., pito, p. and Heuch, C. C. "Basic Laboratory procedures in Clinical Bacteriology". World Health Organization. Geneva (1991).
- 11- Hasan, A.H., Journal of Rafidain Science, Vol. (15), Issue (5). (2004).
- 12- Essa, M.A.; Hamad, B.D.; Alwan, N.J., Journal of Education and Science Volume (24) Issue (3), (2011).
- 13- Gomez-luz, R. Int. Microbiol., 1:279-284, (1998).
- 14- Topf, J. and Faubel, S. "The Microbiology Companion". 2nd ed., National Reproduction Corporation, Michigan, USA. (1994)
- 15- Ramesh, A.; Halami, P.M. and Chandrashekar, A. World J. Microbiol. Biotechnol., 16 (7):695-697, (2000).
- 16- Amabile C.C., Muta. Res. 207(3-4)107-9, (1988).
- 17- Luciana.; Edmar C. and Andréa M. A., Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.48, n. 3 : pp. 379-384, (2005).
- 18- Wameidh M.P., Iraqi Journal of Science. 50(1)37-42, (2009).
- 19- Terawakie, Y.; Takayasu, H. and Akiba, T., J. Bacteriol., 94 (3): 687-690, (1967).
- 20- Al-Rashidy, D.N.M.A, M.Sc. Thesis, College of Education, University of Mosul (2002). (In Arabic).
- 21- Warren, R.; Rogolsky, M.; Wiley, B.B. and Glasgow, R.L., J. bacteriol., 118(3): 980-985, (1974).
- 22- Al-Khafagi, Z.M., "Biological activities of bacteria". Dar Al-Kutib for Printing and Publishing, University of Mosul (1987).