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 **Accepted**
10/02/2013 **08/05/2013**

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* .

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

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

محسن ايوب عيسى
قسم علوم الحياة
كلية العلوم / جامعة الموصل

بشرى دلي حمد
قسم علوم الحياة
كلية التربية / جامعة الموصل

ضحى جاسم محمد
قسم علوم الحياة
كلية التربية / جامعة الموصل

تاريخ الاستلام **2013/02/10**
تاريخ القبول **2013/05/08**

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية توضيح تأثير حامض الاسكوربك Ascorbic acid (فيتامين C) والتحضين بدرجة حرارة 44م في حساسية بكتريا *Salmonell typhi* تجاه عدد من المضادات الحيوية المقاومة لها, واظهرت النتائج ان حامض الاسكوربك كان له تأثيراً في تحييد وازالة صفة المقاومة تجاه عدد من المضادات الحيوية(Penicillin, Erythromycin , Tobramycinو Amikacin) وكان لتركيز الحامض دورا في تاثيره 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 الاسكوربك مركب غير سام تم الاستنتاج بامكانية استخدامه كعلاج مشترك تجاه الاصابة بجرثومة *S. typhi* .

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

المقدمة

أصبحت مشكلة مقاومة البكتريا للأنواع المختلفة من المضادات الحياتية 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 الكلورامفنيكول 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 الهايدروجيني واستخدام المعادن الثقيلة و زمن التحضين وكذلك استخدام مواد كيمياوية مختلفة وغيرها [3] .

تعود مقاومة البكتريا 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 والهيمولايسين Haemolysin وانتاج مستضدات الالتصاق Adhesive antigens ومقاومة المضادات الحيوية وإنتاجها, اضافة الى العديد من الوظائف الاخرى المهمة للبكتريا [4].

وتعد بكتريا *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 [5,7,6] .

فيتامين C يعد من الفيتامينات المهمة جدا للصحة حيث انه يقوي المناعة وعادة يؤخذ في حالات الأنفلونزا والإصابات الفايروسية, وهو مركب متوفر وامن ومعروف علميا باسم حامض الاسكوربك 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 الجزئية لحامض الاسكوربك هي C6H8O6 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 الاسكوربك لعلاج بعض الامراض كمرض الاسقربوط ويستخدم كمضاد للأكسدة ويقلل من الاصابة بالعديد من الاحياء المجهرية الممرضة, ويقوي الجهاز المناعي وكريات الدم البيض , ويختزل البكتريا الممرضة في البيئات الحامضية حيث ان استخدام تركيز 2.5غم من حامض الاسكوربك يخفض pH الادرار الى 5.5 ويعد حامض الاسكوربك احد العوامل المحيدة للبكتريا في مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية واعطاء صفة المقاومة تجاه المضادات الحيوية [8] .

وقد اجري هذا البحث بهدف دراسة قابلية حامض الاسكوربك 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].

1-2 حامض الاسكوربك Ascorbic acid

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

1-3اقراص 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

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

اختبرت الفعالية التثبيطية للمضادات الحيويه على نمو بكتريا *S. typhi* قيد الدراسة باستخدام طريقة اختبار الحساسية (طريقة الانتشار بالأقراص) وبالاعتماد على طريقة Bauer وجماعته سنه 1966 [9] حيث حضر المعلق البكتيري باستخدام انابيب 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 37مْ لمدة 30 دقيقة لكي يحصل التشرب. بعد ذلك ثبتت اقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم على سطح الاطباق الملقحة وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء فترة التحضين تم قياس أقطار التثبيط حول الاقراص.

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

حضر25 مل من المحلول القياسي Stock Solution لحامض الاسكوربك 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 الحجوم التالية (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 الحجوم 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 اخذ0.1 مل من النمو الناتج بالتراكيز المختلفة من حامض الاسكوربك كل على حدة و نشرت على سطح الاكار المغذي باستخدام الماسحة القطنية وتركت الاطباق لتتشرب لمدة 30 دقيقة بعدها وضعت اقراص المضادات الحيوية و حضنت 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 37م . 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 37م لاستخدامه كنموذج سيطرة لملاحظة التحييد التلقائي[11].

بعد انتهاء فترة التحضين اخذ0.1 مل من المزرعة الفتية ونشرت على سطح الاكار المغذي باستخدام الماسحة القطنية وتركت الاطباق لتتشرب 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 مؤخرا 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 المسئولة 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 الاسكوربك في ازالة او تحييد صفة المقاومة لهذه المضادات حيث يتضح من الجدول (3) ان التراكيز(0.5 و1 و 1.5 و 2) ملي مولاري لحامض الاسكوربك اظهرت تأثيرا محييدا لبكتريا *S. typhi* ضد اربعة انواع من المضادات الحيوية قيد الدراسة وهي Amikacin, Penicillin, Erythromycin و Tobamycin مما يؤكد قابلية التحييد التي يمتلكها هذا المركب والتي درست في جراثيم اخرى منها *Pediococcus acidilactics* [15] *Staphylococcus aureus* [16] *Pseudomonas aeruginosa* [17] *Sarratia marcesnces* [18] وان هذه الفعالية المحيدة لحامض الاسكوربك قد تكون ناتجة عن التحورات في خصائص الـ DNA كما انه يعمل على اكسدة الدهون المكونة للغشاء البلازمي وتثبيط العديد من الفعاليات الحيوية ويؤثر على عملية

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

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

واذا ما اخذنا بنظر الاعتبار ان حامض الاسكوربك 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) تأثيرالتراكيز المختلفة لحامض الاسكوربك على حساسية البكتريا المدروسة تجاه المضادات الحيوية المقاومة لها(قطر التثبيط بالملم).

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

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]،وبقيت الجرثومة مقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin مما يتفق مع دراسات على جراثيم اخرى تؤكد عدم تاثر 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 الحراره 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 واشار الى ان معدل الفقدان التلقائي للصفة المدروسة تتأثير بالمواد الكيمياوية المحيدة و درجات الحرارةالعاليةحيث تعمل على زيادة معدل فقدان هذه الصفات.

ان درجات الحرارة المرتفعة تحفز البكتريا على بناء بروتينات الصدمةالحراريةHeat shock proteins وهذه تسمى بالوصيفات Chaperones والتي تستنسخ 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 الاسكوربك كانت الحرارة ذات تاثير اوسع مع ملاحظة تاثير حامض الاسكوربك على المضاد Erythromycin الذي لم يتاثر بالحرارة كما انه من الناحية التطبيقية بالإمكان استخدام حامض الاسكوربك في العلاج المشترك مع المضادات الحيوية.

شكر وعرفان

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 pathologenic 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).