دراسة تاثير حامض الاسكوربك على نمو العنقوديات الذهبية الممرضة لوحده وخلطا مع بعض المضادات الحيوية

هناء سليم يوسف

قسم علوم االحيا ة، كلية العلوم ، جامعة بغداد

الخلاصة

عزلت 115 عزلة من بكتريا *Staphylococcus aurous* من جروح وحروق بشرية ملوثه ،درس مدى مقاومتها للمضادات الحيوية الشائعة الاستعمال با ستعمال اقراص الحساسية ، بعدها تم تحديد قيم التركيز المثبط الادنى للنمو بطريقة تخفيف الانابيب . وجد ان هنالك تباين في هذه القيم للمضادات الحيوية المختلفة ، واعطت عزلتان فقط مقاومة عالية ولجميع المضادات . وعند دراسة تاثير حامض الاسكوربيك لوحده وعند خلطه مع المضادات الاخرى وجد ان له تاثير على خفض قيم التركيز المثبط الادنى للمضادات الحيوية الذي كان واضحا من خلال متابعة النمو في المزارع السائله.

المقدمة

تعتبر بكتريا *S. aureus* من البكيريا المهمة طبيا لانتشارها الواسع وقدرتها على المعيشة في ظروف بيئية مختلفة وياتي العاملون في المستشفيات في مقدمة مصادر التلوث لكونها تستوطن الانف واللوزتين والحنجرة لنسبة كبيرة منهم[(1) .

وقد لحظ الباحثان(2) Tong و(3)Matsumate ان *S. aureus* هي البكتريا السائدة في التهابات جروح العمليات كما لوحظ ان اغلب البكتريا المعزولة من جروح وحروق متقيحة مقاومة لعدد كبير من المضادات الحيوية (4)وترجع مقاومتها هذه الى امتلاكها اليات متعددة للمقاومة (5)و (6) لتقليل المقاومة استعملت مواد اخرى مع المضادات الحيوية في علاج الحلات المزمنة (8,7) من بين هذه المواد هو حامض الاسكوربك .

لحظ الباحثون سنة 1953 ان حامض الاسكوربك عند خلطه مع التركيز تحت المثبط من كبريتات النحاس وبيكاربونات الصوديوم سوف يقتل *Pseudomonas aeruginosa* خلال 5 دقائق (8) وبما ان مثل ها الخليط غير ملائم للعلاج في الاصابات الجهازية او اصابات الحروق فقد تم التفتيش عن مواد اخرى تكون ملائمة لمثل هذه الحالات)(8)(9)(10) . حيث وجد ان حامض الاسكوربك له تاثير تازري مع بعض المضادات الحيوية المستخدمة انفا وان هذا التاثير يكون من خلال تغيير في السلسلة التنفسية عن طريق احلال محل عناصر معينة او التفاعل معها (8,11)في حين اشار(7) الى ان التاثير

التثبيطي لعمل امض الاسكوربك ناتج عن الاكسدة الذاتية وتحرير بيروكسيد الهيدروجين الى الوسط .اما [(7و9) فاشاروا الى ان تاثير حامض الاسكوربك في تقليل المقاومة ناجمة عن فقدان البلازميد المسؤول عن المقاومة نتيجة المعاملة بحامض الاسكوربك .

هدف البحث هو دراسة تاثير حامض الاسكوربك مع المضادات الحيوية واهميتة في تقليل المقاومة وبالتالي زيادة فعالية هذة المضادات .

المواد وطرق العمل

اولا : المواد المستخدمة :

1-وسط المانتول المملح لعزل وتشخيص العنقوديات الذهبية.

2- وسط تحلل الدنا(Oxoid) لاختبار قابلية البكتريا على انتاج الانزيم المحلل لل DNA . جرى تحضير الاوساط الزرعية وفقا للتعليمات المرفقة.

3- بلازما دم انسان (حضر مختبريا) لاختبار فحص التجلط (Coagulase test)

4- وسط مولر – هنتون(Oxoid) لدراسة حساسية العزلات للمضادات الحيويه.

5- وسط الببتون السائل Peptone salt agar (Oxoid) لتحديد قيم التركيزالمثبط الادنى للمضادات.

6- Ascorbic acid (Roche)

المضادات الحيوية :

Penicillin; Ampicillin G Gentamycin Tobramycin Erythromycin Streptomycin; Methoprim; Cloramphinicol (Lilly)

طرق العمل

أ- عزلات *Staph.aureus*: – تم اخذ العينات من اشخاص يعانون من جروح وحروق والتهابات جلدية لمراحل عمرية مختلفة باستعمال قطايل معقمة ورطبة حيث تم تخطيطها على وسط المانتول. بعدها اختيرت المستعمرات المخمرة للمانتول واجري لها فحص تجلط الدم حسب ماجاء في المصدر (12)

ب-اختبار الحساسية للمضادات الحيوية الشائعة الاستعمال تم بطريقة الناشرspreading على وسط المولر –هنتون، وبعد ترك الاطباق لتجف قليلا وضعت اقراص المضادات وتم حضن الاطباق بدرجة 37 مئوية ولمدة24 ساعة بعد ذلك تم قياس قطر منطقة التثبيط Inhibition zone المتكونة حول منطقة القرص، اجري الاختبار حسب ماجاء في المصدر (13)

ج- تحضير محاليل الخزن:- حضر محلول(ascorbic acid) بتركيز40mg/ml في وسط المرق المغذي وتم حفظ الpH 7.4±0.2 بواسطة ٪ 10 NaOH كما حضرت المضادات وفق التراكيز التالية :

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز
1-Methoprim	Me	1mg/ml
2-Ampicillin	Am	500µg/ml
3-pencillin G	G	500µg/
3-Pencillin G	P	
4-Erythromychn	E	500µg/ml
5-Chloramphinicol	C	1mg/ml
6-Gentamycin	G	50µg/ml
7-Tobramycin	T	50µg/ml
8-Streptomycin	S	100µg/ml

تم التعقيم بطريقة الترشيح بالاغشية .

د- طريقة التخفيف بالابابيب عملت وفق المصدر(13). حضنت الانابيب بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة وقرات النتائج حيث اعتبر التركيز الذي يمنع النمو هو التركيز المثبطالادنى(MIC).

هـ- منحنى النمو عمل لعزلة من (*Staph.aureus*) مقاومة لاغلب المضادات الحيوية فقد حضرت دوارق تحوي على 200 مل من الوسط الزرعي (المرق المغذي) موزعة كلاتي :-

دوارق تحتوي على حامض الاسكوربك فقط بتركيز 0.3 a-

دوارق تحتوي على المرق المغذي فقط.b-

C- دوارق تحتوي على نصف التركيز المثبط الادنى من المضاد + (حامض 0.3mg⁄ml).

لقحت جميع الدوارق بـ0.1ml من مزرعة بعمر 24 ساعة ، قرات النتائج كل نصف ساعة بجهاز spectronic 20 وبطول موجي مقداره 560 nm. وعمل منحنى النمو.

النتائج والمناقشه

بعد عزل 115 عزله من*Staph.aureus* الممرضه من اصابات جروح وحروق مختلفه تم اجراءالاختبارات االتشخيصيه عليها على اساس اعطائها الفحص الموجب لاختبار تجلط البلازما وتخميرها للمانتول وافرازها انزيم DNase الثابت بلحراره. وقد شخصت اعتمادا على المرجع(13).وتم اختبار الحساسيه للمضات الحيويه بطريقه اقراص الحساسيه . اظهرت النتائج في الشكل (1)ان النسبه الاكبر من البكتريا كانت مقاومه للامبسلين ثم البنسلين يليها وعلى التوالي كلورامفينيكول ثم الستربتومايسين والاريثرومايسين والميثبريم . اما مجموعه المضادات الامينوكلايكوسيديه المتمثله بالتوبرامايسين والجنتمايسين فكانت اقل نسبه من البكتريا مقاومه لها، تستعمل هذه المضادات اساسا في معالجه الاصابات الناجمه عن البكتريا السالبه لصبغه كرام. ومن ملاحظه النتائج نجد هنالك نسبه كبيره من العزلات مقاومه للمضادات.

في دراسه للنجار(4) نجد هنالك تشابه في نسبه البكتريا المقاومه للامبسيلين والبنسلين-ج ويعتقد هذا بسبب افراز انزيم البنسلينيز في حين هنالك اختلاف في نسبه البكتريا المقاومه للمضاد الستربتومايسين رغم انه من المضادات الامينوكلايكوسيديه ايضا الا انه الاقدم والاكثر استخداما في السابق .اما المضادات الجنتامايسين والتوبرامايسين الجيل الاحدث والاقل استعمالا للمضادات الاخرى.

يلاحظ ان المقاومه للمضادات التتراسايكلين والستربتومايسين والكلورامفينيكول تاتي بلدرجه الثانيه وهي تعود الى افراز انزيمات مثبطه للمضادات الحيويه والى حاجز النفاذيه(14) ففي حين ان المقاومه للجنتامايسين والتوبرامايسين فتعود بالدرجه الاساسيه الى وجود حاجز النفاذيه فلو امكن تغيير صفات هذا الحاجز امكن تقليل مقاومه البكتريا لهذه المضادات.

تم اختيار عشرة عزلات عشوائيا لايجاد قيم التركيز المثبط الادنىMIC حيث اثبت الدراسه ظهور تباين في هذه القيم وخاصه بلنسبه للمضاد الامبسيلين والبنسلين -ج .وكذالك للستربتومايسين والايرثرومايسين ويمكن ملاحظه ذالك من الجدول رقم (1) ويرجع هذا التباين في القيم الى ضروب العزلات نفسها والاليات التي تمتلكها البكتريا المقاومه للمضادات ومدى تعرض الشخص المصاب للمضادات الحيويه . يلاحظ بشكل عام ارتفاع قيم التركيز المثبط الادنى MIC للمضادات المختلفه مقارنه بلمصدر(4) وهذا يعود الى شيوع استعمال المضادات الحيويه مقارنه بلسنوات السابقه مما يؤدي الى ظهور عزلات ذات مقاومه عاليه.

تم اختيار البكتريا التي تحمل اعلى قيم للمقاومه لدراسة تاثير حامض الاسكوربك على قيم التركيز المثبط الادنى MIC من الشكل رقم(2) يلاحظ وجود عزلتان فقط مقاومه لجميع المضادات الحيويه ، اختيرت احداهما لدراسة تاثير حامض الاسكوربك من خلال متابعة الخط البياني لنموها ومقاومته لعدد معين من المضادات الحيويه وكما

يلاحظ في الشكل رقم(3) (a,b,c,d,e,f) فقد ظهرفي جميعها تازر واضح في عمل حامض الاسكوربك وتاثير المضاد فيما كان هنالك انخفاض واضح في مقاومه البكتريا للمضادات المستعمله .

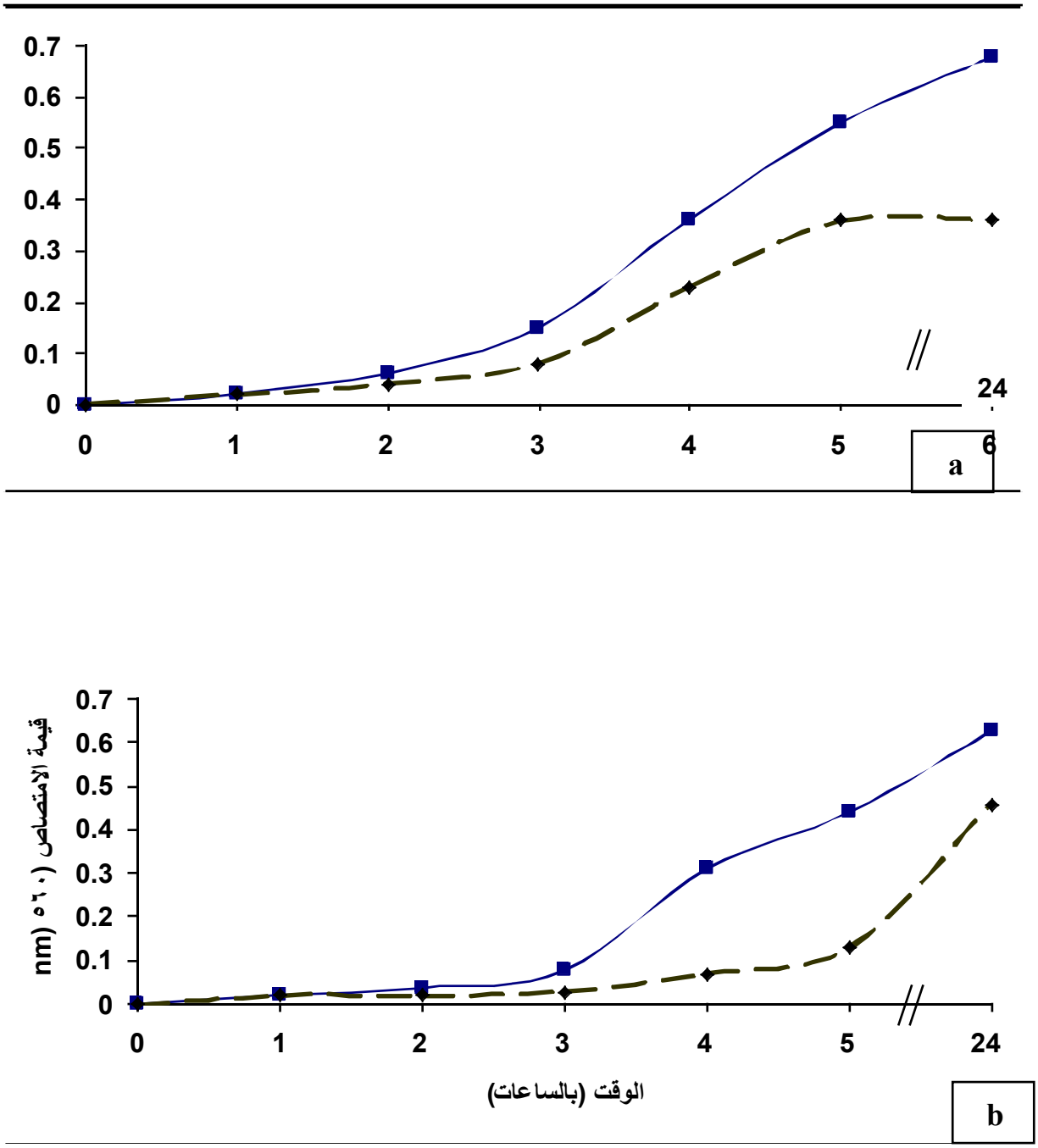
ولاحظ مثل هذا التاثير كلا من(8) Rawal *et al* و(11) Rawal& charles ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginos*a وقد بين الباحثان ان عمل حامض الاسكوربك ناجم عن الاكسده الذاتيه وتحرير بيروكسيد الهيدروجين الى الوسط.

كما ان حامض الاسكوربك استعمل كعامل مختزل من قبل (6,7) ضد بكتريا hemolytic streptococci واستعمل خلطا وبتركيز 600 ملغم مع مواد اخرى في علاج الاصابات الناجمه عن بكتريا ذات مقاومه عاليه للمضادات وبضمنها *S.aureus* المسببه لقرحه الفراش ، ولم تظهر هذه البكتريا بعد العلاج . اما الباحث(5,9) فعزى تاثير حامض الاسكوربك على هذه البكتريا ناجم من فقدان بلازميد المقاومه R-plasmid وان تاثيره انتقائي على البكتريا متعدده المقاومه .

من خلال هذه الدراسه يمكن استنتاج امكانيه استخدام حامض الاسكوربك مع مواد اخرى مثل المضادات الحيويه وبتراكيز اقل من التركيز المثبط الادنى لعلاج الاصابات الناجمه من جراء بكتريا مقاومه للمضادات الحيويه وخاصه في علاج الاصابات الجلديه لتقليل مقاومه البكتريا وجعل المضادات اكثر كفاءة في العمل .

المصادر

1-Kloos, N.E. (1980) Ann.Rev.Micro.34:559-592.
2- Tong, M.J. (1972). J.Aed.Assoc. 219: 1044-1047.
3-Mastumato, M.C.; Wyte, S.R.; Mosely, RV.,and. Hawley,R.J.(1969).Milit.Med. 13:655-665.
4-Al-najjar,A.R. (1989). J. Biol .Seri.20(1) :85-94.
5- Krishtinnsen,J.E. and Ameral,L.(1997).Antimicro.Chem..40,319-327.
6-Dioxons,S.R.Brumfitt,W. and Hamilton,M.(1985). Infection. 13:35-43.
7- Shoeb,H.A.;Al-shora,HI. and Abdel-Salam,T.91995). appl.Micro., 21,398-401.
8-Rawel,B.D. (1978).Chem.Ther. 24: 166-171.
9-Amabile-Cuevas,C.F.; Pina-Zenteller,R and Wahlaborde,M.E.,(1991). Muta.Res. 264:119-125.
10-Mulligan,M.E.,Murry,L.A.,Ribner,B.S.,and Stanford,H.C., (1995). Am.J.Med. 98,599-600.
11-Rawel,B.D.,and Charles,B.G.,(1972). J.Tropic.Medd.Publ.Helth.3 (2)222-227).
12-Safik,M.H.andMuslh,R. (1988).J.Bio.Sci.Res. 19:611-622.
13-Rhman,G.T.,(1989).Study of enterotoxin produced by S.aureus from different food groups & clinical materials in Mousl.Msc.Theiss. University of Moul.
14-Baryant,M.C.,(1972).Antibiotics & their laboratory control.2nd.ed.Butterwths,London.
15-Mates,S.M.,Esemberg,E.S.,&MandelL.J.(1982).Natio.Acad.of scie.79:6693-6697..

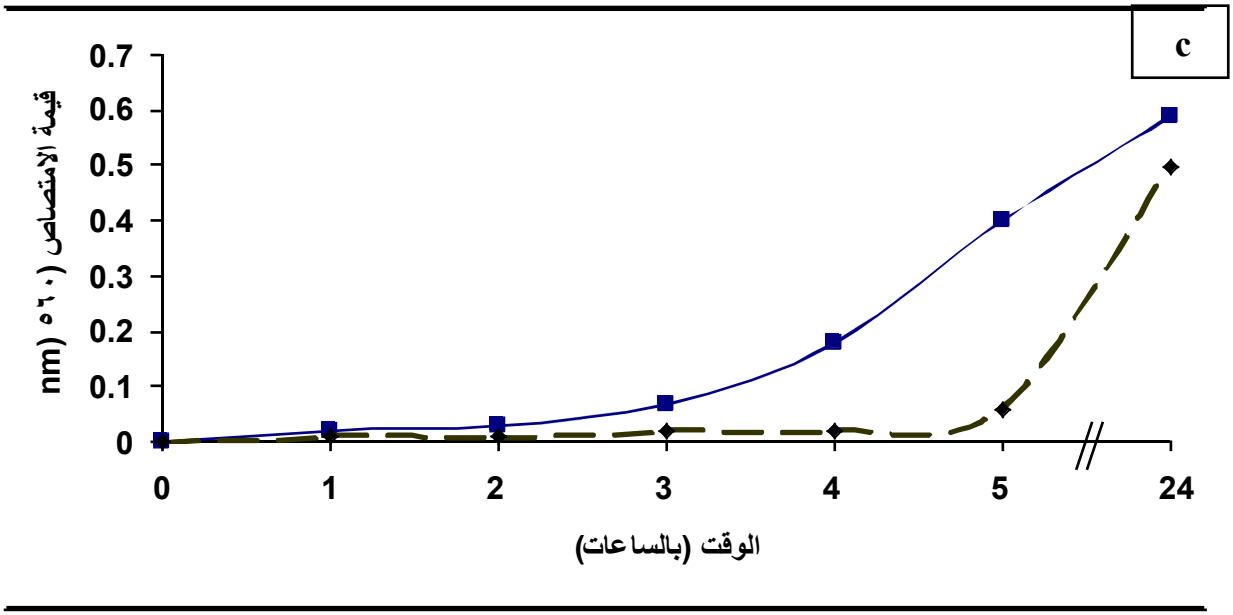


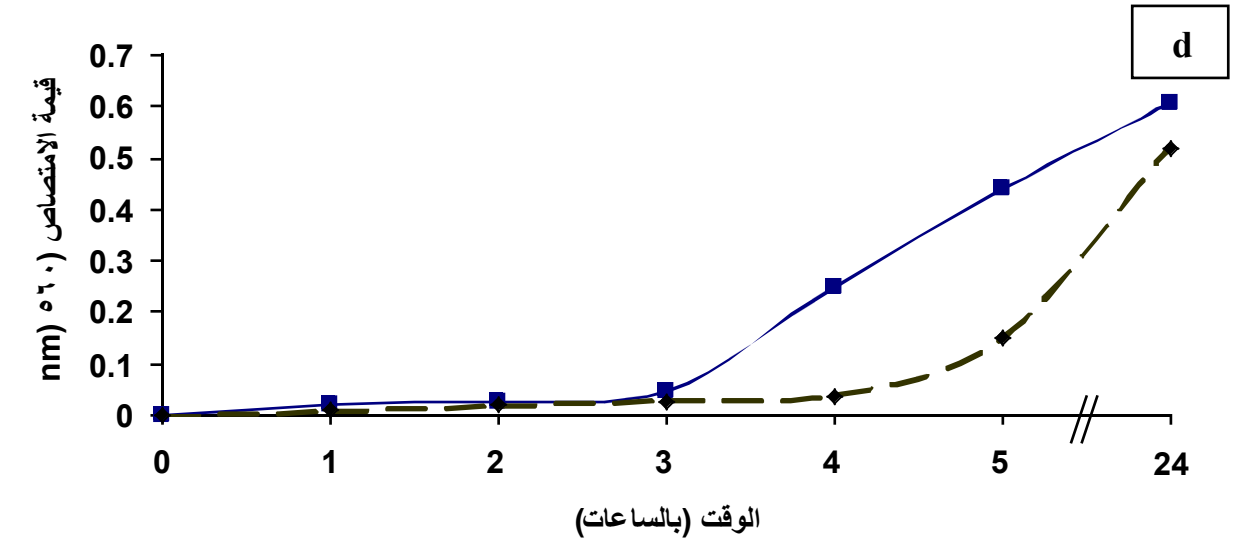
شكل (3) تأثير حامض الاسكوربيك على *S. aureus* (Growth curve study).

اسكوربك اسد . ml / 0.3 mg + n. broth فقط الخط المنقطع (control) nutrient broth – الخط المستمر a

+ 0.3 mg n. broth + 1/2 MIC-Am الخط المنقطع n. broth + 1/2 MIC (Am) – الخط المستمر b

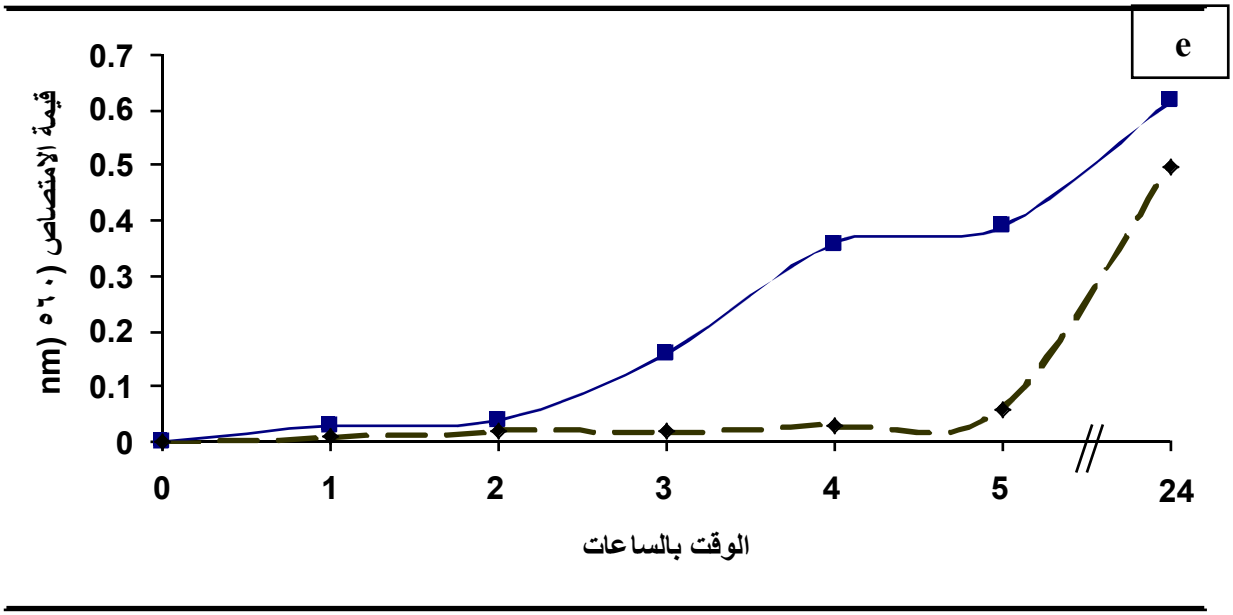
حامض الاسكوربك. ml /

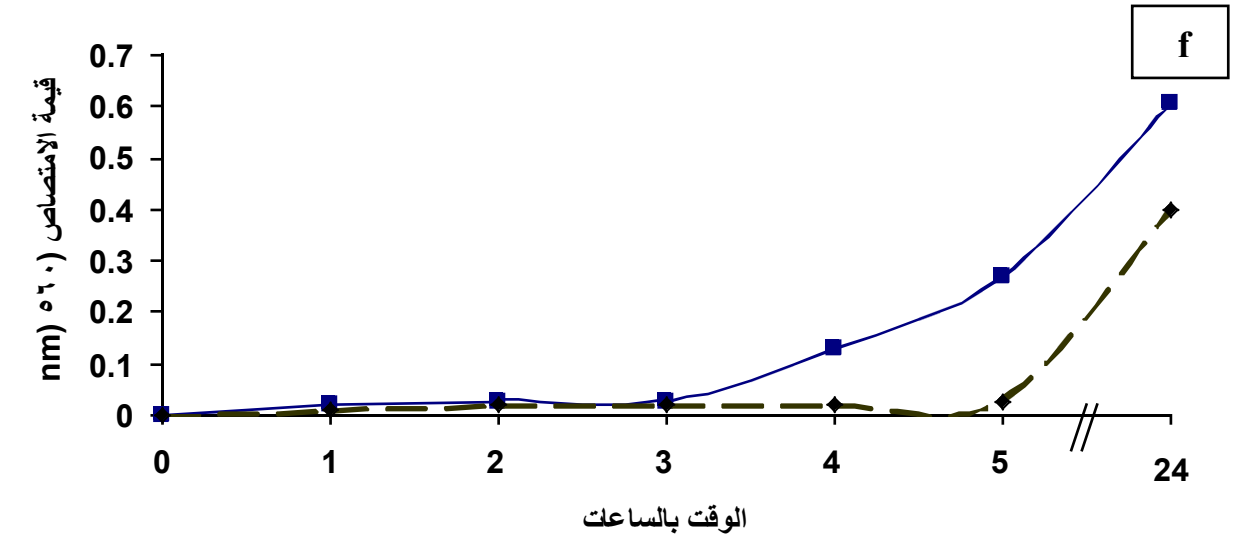




شكل (3) c الخط المستمر – (control) nutrient broth + 1/2 MIC. T. والخط المتقطع n. broth + 1/2 MIC + 0.3 mg / ml. اسكوربك اسد

d الخط المستمر – n. broth + 1/2 MIC-Me الخط المتقطع n. broth + 1/2 MIC-me + 0.3 mg/ml. حامض الاسكوربك



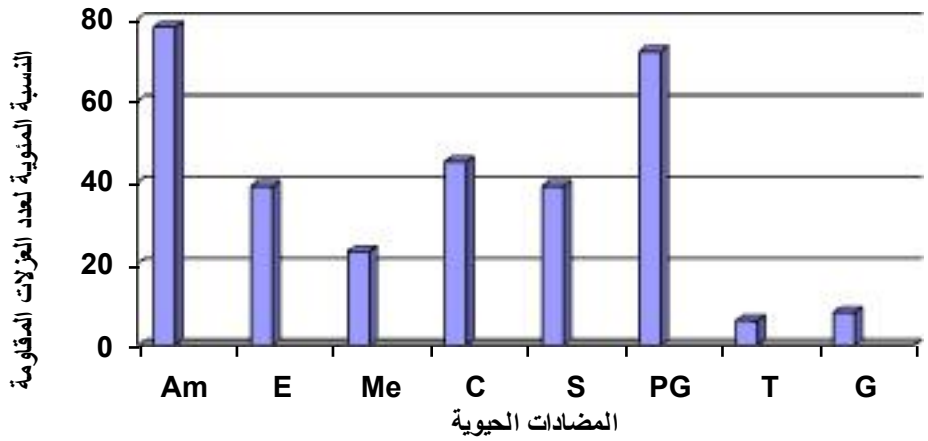


شكل (3) e – الخط المستمر (control) nutrient broth + 1/2 MIC.E. والخط المتقطع n. broth + 1/2 MIC-E + اسكوربك اسد 0.3 mg / ml.

f – الخط المستمر n. broth + 1/2 MIC-C الخط المتقطع n. broth + 1/2 MIC-C + 0.3 mg / ml. اسكوربك اسد

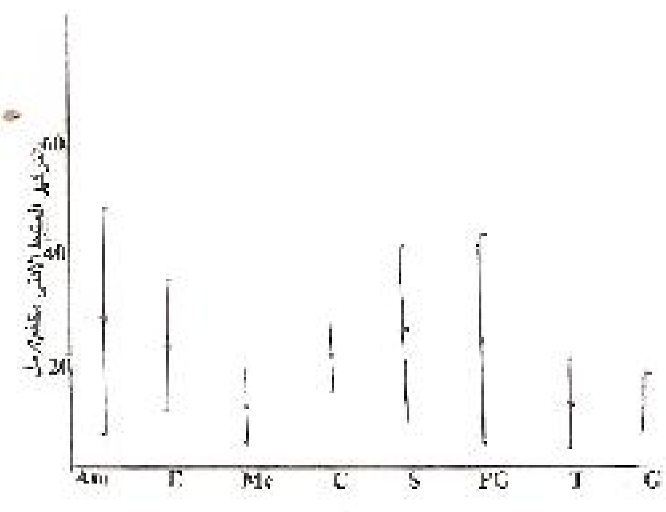
جدول (1) : تأثير حامض الاسكوربك على قيم التركيز المثبط الادنى (MIC) للمضادات الحياتية المستعملة ضد *S. aureus* المعزولة من الجروح الملوثة (العزلات المستعملة هي الاكثر مقاومة والتي تمتلك اعلى قيمة MIC للمضاد).

قيم MIC معطاة Mg / ml			النسبة المختزلة في قيم MIC (%)
رمز المضاد الحيوي	المضاد فقط	المضاد + حامض الاسكوربك 0.3 mg / ml	
Am	50	40	20
E	35	25	28.5
Me	20	15	25
C	25	15	40
S	40	35	12.5
P_G	45	30	33.3
T	15	10	33.3
G	20	20	0



شكل (1) مقاومة العزلات الممرضة من *S. aureus* (عدد العزلات 115) للمضادات الحيوية (طريقة اقراص الحساسية) وتركيز المضاد Mg / Disc Am (25) , E (30) , Me (20) , C (50) , S (30) , P_G (25) , T (10) , G (10)

.



شكل (2) التغاير في قيم التركيز المثبط الادنى للمضادات الحيوية ضد عشر عزلات لبكتريا متنوعة من *Staph. aureus* المعزولة من شعوبات . الاشرطة تمثل معدل قيم التركيز المثبط الادنى.

Effect of Ascorbic Acid on Pathogenic *Staphylococcus aureus* Growth singly and in Combination with Some Antibiotics

H. S.Yossef
Department of Biology,College of Science , University of Baghdad

Abstract

One hundred and fifteen isolates of *Staphylococcus aureus* were isolated from human infected wound and burn. The resistance of this organism for eight commonly used antibiotics was determined by disc diffusion methods.

The minimum inhibitory concentration MIC was determined for each drug by tube dilution method. Results showed significant variations in the MIC values. It was found that two isolates had high resistance for the eight antibiotics used. Effect of ascorbic acid on bacterial growth was studied singly and in combination with antibiotics. Reductions in MIC value were reported for different antibiotics when tested by growth curve method too.