

تطوير نظام بكتري لتحديد المطفرات في البيئة والاعذية

رابعاً: استعمال المطفرات المحورة هيدروكسيل أمين

غيث لطفى العزاوي

زهرة محمود الخفاجي

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٥/٩/٦

الخلاصة

استعمل المطفر المحور (HA) Hydroxylamine لدراسة استجابة عزلات G-system المكون من (Bacillus) G3 (Arthrobacter) G12 (Brevibacterium) G27 التي اعطت استجابة موجبة باستعمال المطفر القياسي (NTG) Nitrosoguanidine. عوملت العزلات بطروف وتراكيز متزايدة متشابهة بالنسبة للمطفرين.

اسفرت النتائج عن ان HA يؤدي الى خفض عدد الخلايا الحية المتبقية كما هو الحال مع NTG. حيث HA طفرات مقاومة للستربتومايسين بشكل اكبر من NTG في حين كانت قدرته على حيث طفرات مقاومة للريفايميسين بشكل اقل من NTG، والذي انعكس بشكل مشابه على تردد الطفرات المستحثة. اما قابلية العزلات للتطفر Relative mutability فقد كانت العزلة G12 هي الاكثر قابلية، وقد كانت العزلة نفسها الاكثر حساسية للاستجابة للمطفرين.

المقدمة

لذلك فالعمل مستمر على ايجاد العديد من الانظمة لتحديد المطفرات وذلك لاخذ صورة واضحة عن المواد المطفرة.

ويستهدف الجزء الحالي من الدراسة (والذي هو ضمن سلسلة من الدراسات) الكشف عن قابلية المطفر (HA) Hydroxylamine على النظام البكتري الذي استعمل في تحديد المطفرات الغذائية والبيئية (١١) ومقارنة ذلك مع عمليات التطفير التي يحدثها المطفر (NTG) Nitrosoguanidine.

المواد وطرق العمل

الايوساط الغذائية:

- وسط اكار اساس الدم Blood agar base من شركة England /Mast
- وسط المرق المغذي Nutrient broth من شركة Germany/Merck
- محلول التخفيف، استعمل 0.1% من التربينون (Oxoid) في الماء المقطر.
- محلول دارى الفوسفات: حضر بتركيز ٠,٠٥ عياري وعدل الاس الهيدروجيني ٥,٥ باستعمال محلول عياري من حامض الهيدروكلوريك (HCl).

اثبتت العديد من الدراسات ان العلاقة وثيقة بين التطفير والتسرطن التي تحدث في الانظمة الحيوية (١)، اذ وجد ان ٦٥% من التسرطنات العضوية هي مواد مطفرة (٢) وقد وجد ان هناك اتفقا كبيرا من الناحية النوعية بين قابلية المواد على التطفير والمواد المولدة للاورام (٤،٣).

وقد اصبح تحديد القابلية التطفيرية في الانظمة البكتيرية اكثر قبولا كخطوة اولى لتحديد القابلية لتسرطنية خاصة للمواد الجديدة (5) وذلك يعود الى ان الانظمة المايكروبية هي انظمة حساسة ويمكن ان تؤدي الى حدس خطورة المواد المسرطنة (6) وتستخدم الانظمة المايكروبية في تحديد السمات الوراثية (Genotoxicants) في البيئة مثل التربة وكذلك تستخدم في تحديد صلاحية الادوية المستعملة في علاج السرطان (7،٩،٨) ولعل اهم الانظمة المايكروبية وعلى وجه الخصوص البكتريا هو استعمال سلالات ايمس (١) او استعمال سلالات خاصة من *Echerichia coli*، وتستخدم ايضا خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* (١٠). ونظرا لعدم وجود نظام واحد يمكن ان يكشف عن مواد مطفرة مختلفة (١١)،

اذ ان بعض المواد لم تثبت قابليتها للتطفير في نظام ايمس *Salmonella typhimurium* ولكن امكن اثباتها باستعمال بكتريا *Bacillus* (١٢).

المضادات الحيوية:

- الستربتومييسين: استعمل بشكل كبريتات Streptomycin sulphate من شركة India/Ajanta.
- الريفامبين Rifampicin: من معمل الادوية في سامراء (SDI) / العراق.
- صبغة البلور البنفسجي Crystal violet: من شركة England /BHD.
- المطفر: استعمل Hydroxylamine (HA) من شركة Fluka /سويسرا.

العزلات البكتيرية:

عزل عدد من البكتريا من نماذج تربة من مناطق بعيدة عن مصادر التلوث والمدن ، تم إجراء التخفيف اللازمة وزراعتها على وسط اكر اساس الدم وحضنت بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة للحصول على مستعمرات معزولة.
. اختيار تركيز المضاد الحيوي : تم باستعمال طريقة التدرج بالتركيز في الأطباق (١٣)
. اختبار الحساسية لصبغة البلور البنفسجي: استعملت تراكيز متدرجة من الصبغة ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧ مللغرام /مللتر وحددت حساسية العزلات باستعمال طريقة الأفراس الورقية (١٤)
. تحديد عدد البكتريا الحي (Viable count): تم باستعمال الطرق المعتمدة في هذا المجال (١٥)

اختبارات التطهير:

تم تحضير مزروع لوغارتيمي للعزلات التي تم انتخابها في من وسط المرق المغذي السلي كثافة ضوئية OD_{٦٠٠} بحدود ٠,١٥ - ٠,٢٥ . فصلت الخلايا عن الوسط بالطرد المركزي وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات باس هيدروجيني ٥,٥ ثم علقت بنفس الحجم من دارئ الفوسفات وقسمت إلى عدة أقسام بحجم ٥ مللتر ، وحدد العدد الحي للخلايا في وقت الصفر ، ثم عوملت النماذج بتراكيز متدرجة من NTG (٥، ١٠، ٥٠، ٧٥، ١٠٠) مايكروغرام/مللتر لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ٣٧ م ، بعد ذلك فصلت الخلايا من المحلول وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات ثم علقت وحدد العدد الحي بعد المعاملة مباشرة ، وكذلك زرعت النماذج على أوساط حاوية على الستربتومييسين والريفامبين لتحديد الطفرات المقاومة . ثم حضنت النماذج بدرجة ٣٧ م لليوم الثاني لغرض التعبير الظاهري Phenotypic expression (١٥) وفي اليوم التالي تم تحديد عدد الخلايا الحي وكذلك تم تحديد عدد الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية الستربتومييسين ، الريفامبين (١٦، ١٧)

الحسابات:

أجريت الحسابات وفق المراجع الخاصة (١٩)
١. تحديد الجزء الحي المتبقي Survival (Sx) fraction
 $Sx = Ns/No$
x تركيز المطفر
S عدد الخلايا المتبقية بعد المعاملة مباشرة
No عدد الخلايا الحية في نموذج السيطرة (بدون معاملة)
٢. تردد Lethal hits (Hx) وفق المعادلة
 $Sx = exp [- Hx]$
٣. تردد الطفرات Mutant (Mx) frequency
 $Mx = N_m x / No$
N_mx عدد الطفرات المستحثة عند التركيز x
٤. حاصل الطفرات Mutant yield (Yx)
 $Yx = N_m x / No$
٥. أعلى حاصل للطفرات عند تركيز معين أو عند اقل تركيز مستعمل Y_{max}
٦. قابلية الخلايا للتطهير النسبية (Rmt) Relative mutability

$$Rmt = Y_{max} / Hx$$

٧. حساسية التطهير النسبية

Relative mutational sensitivity (Rms)

$$Rms = Y_{max} / x$$

٨. كفاءة المطفر Mutagen efficiency

Mut . Eff. = No. of mutants /ml /μg mutagen

النتائج والمناقشة

استعمل في الدراسة ثلاثة عزلات مختلفة الاجناس وهي Bacillus (G12) (G3) وBrevibacterium Arthrobacter (G27)
عزلت من التربة حساسة للستربتومييسين (١٠ مايكروغرام / ملليتر) والريفامبين (٢٠ مايكروغرام / ملليتر) (١٢) وذلك لان المقاومة لهذه الصفات هي صفات كروموسومية Chromosomal genetic markers في اغلب الاحياء (١٨) ، والمطفر المستعمل في هذه الدراسة هو Hydroxylamine (HA) ذو وزن جزئي ٦٩,٤٩ دالتون والذي يعد من المطفرات المحورة للقواعد النروجينية حيث يؤدي الى ازالة مجموعة الامين من القاعدة النروجينية Cytosine وبالتالي يحول زوج القواعد C=G

نانومول (٢٠) كما لا يستبعد ان تكون للعزلة G_{12} G_{27} ، كما يتضح من الشكل اعلاه قابلية اصلاح عالية كما يحصل في العديد من الحالات حتى في مقاومة المطفرات القوية مثل NTG (٢١، ٢٢، ٢٣، ٢٤).

من مؤشرات كفاءة المطفرات هو حاصل الطفرات mutant yield ($Y\chi$) لذلك حسب Y_{max} (وهو حاصل الطفرات عند اقل تركيز) لمقارنة كفاءة اداء كل من المطفرين في عزلات النظام كما موضح في (الشكل ٣) ومقارنة ذلك بكفاءة NTG عند تركيز ١٠ مايكروغرام/مللتر، وتوضح النتائج ان كفاءة HA في حث طفرات مقاومة للستربتومييسين اكثر من NTG.

ومن المؤشرات الاخرى التي يمكن ان تؤخذ بنظر الاعتبار في تحديد فيما اذا كانت المادة مطفرة ام لا وهي زيادة تردد الطفرات بزيادة التراكيز (١، ٢٤، ١٥) وذلك موضح في (الشكل ٤) الذي يوضح ان هناك استجابة على شكل زيادة في عدد الطفرات. يلاحظ ان HA اقل كفاءة مقارنة بالـ NTG وهذا يعكس اختلاف تركيب المادة الوراثية، اذ ان HA يعمل على ازالة مجموعة الامين من الساييتوزين (كما ذكر انفا) والتي قد تكون هذه المناطق (الخاصة بالتنشيف لانزيم RNA Polymerase) قليلة المحتوى في هذه القاعدة التروجينية. والاختلاف في تأثير HA مسجل في سلالات ايمس كذلك كما في السلالات TA100, TA98 (٢٠٠١).

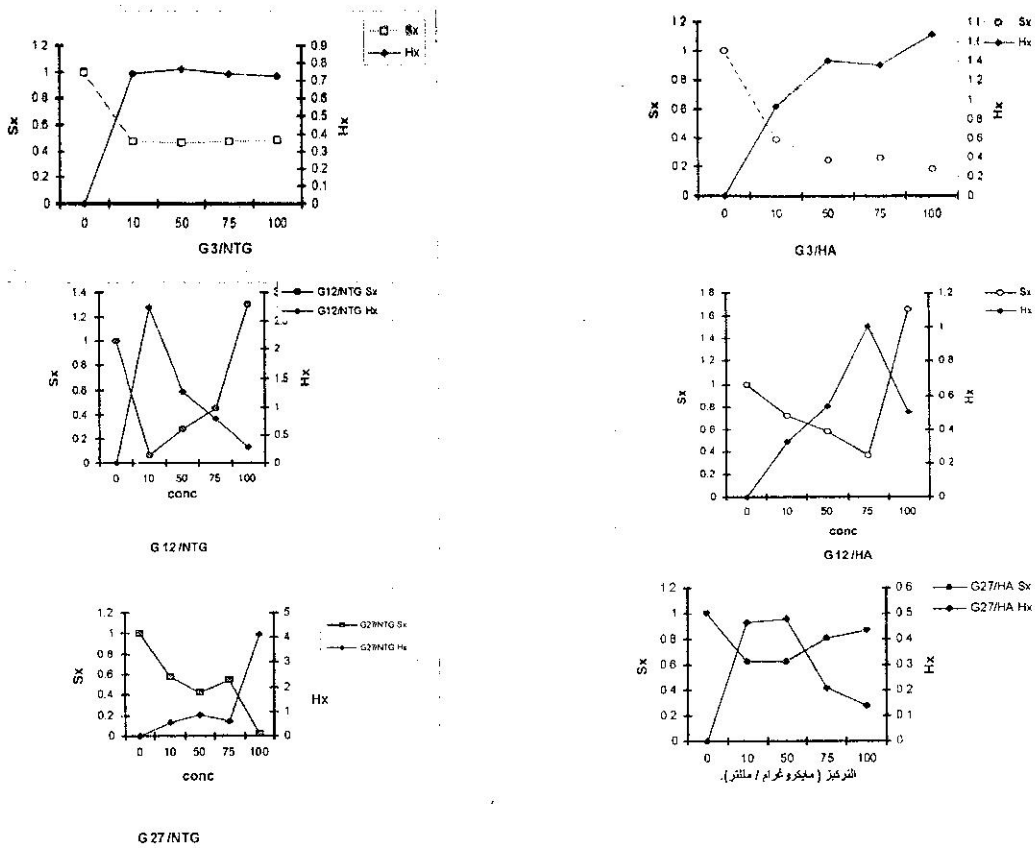
ولعل الصورة تصبح اكثر وضوحا بقياس او حساب كفاءة المطفر والتي تمثل عدد الطفرات المستحثة للوحدة الوزنية كما موضح في (الشكل ٥) ومرة اخرى يلاحظ ان HA كفاءة في حث طفرات المقاومة للستربتومييسين ولكن ليس للريفاميسين.

ولقياس كفاءة العزلات على التطفير حسبت Relative mutability (R_{mt}) كما موضح في (الشكل ٦) بالنسبة للطفرات المقاومة للستربتومييسين والطفرات المقاومة للريفاميسين ومنها يتضح ان العزلة G_{12} هي الاكثر قابلية للتطفر سواء بالـ HA او NTG.

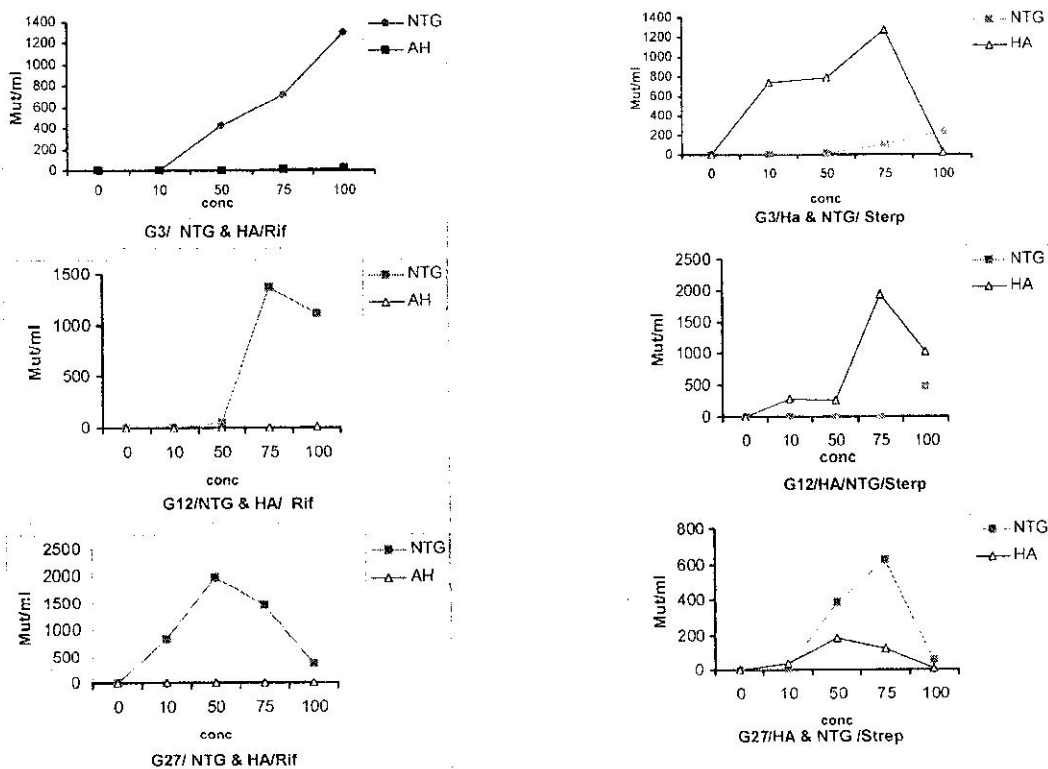
اما حساسية العزلات للتطفير بالمطفرات وقياس (R_{ms}) Relative mutational sensitivity موضحة في (الشكل ٧) ويتضح ان العزلة G_{12} هي الاكثر حساسية وهذا يتفق مع كون العزلة هي الاكثر قابلية للتطفر (١٦).

الى $A=T$ (١٥) ويوضح (الشكل ١) تأثير HA على مدى بقاء Survival fraction ($S\chi$) في الخلية ومقارنة ذلك بالمطفر القياسي NTG، ويلاحظ ان العزلة G_3 قد بقي منها اعداد عند المعاملة بالمركب HA مقاربا للمعاملة بالمركب NTG. وقد تشابه تأثير HA و NTG عند استعمال العزلة G_{12} فيلاحظ حدوث انخفاض في مستوى الجزء الحي المتبقي في التراكيز الواطئة الا انه يعود للارتفاع عند التركيز ١٠٠ مايكروغرام/مللتر وهذا قد يعود الى تنافس الجزئيات عند الحدود الخارجية للخلايا وعدم امكانية دخولها الى داخل الخلية، او ان المطفر يستمر في التأثير والذي يؤدي الى حث طفرات مخمدة Suppressor mutants وبالتالي يؤدي هذا الى الغاء العديد من الطفرات المميئة (١٠).

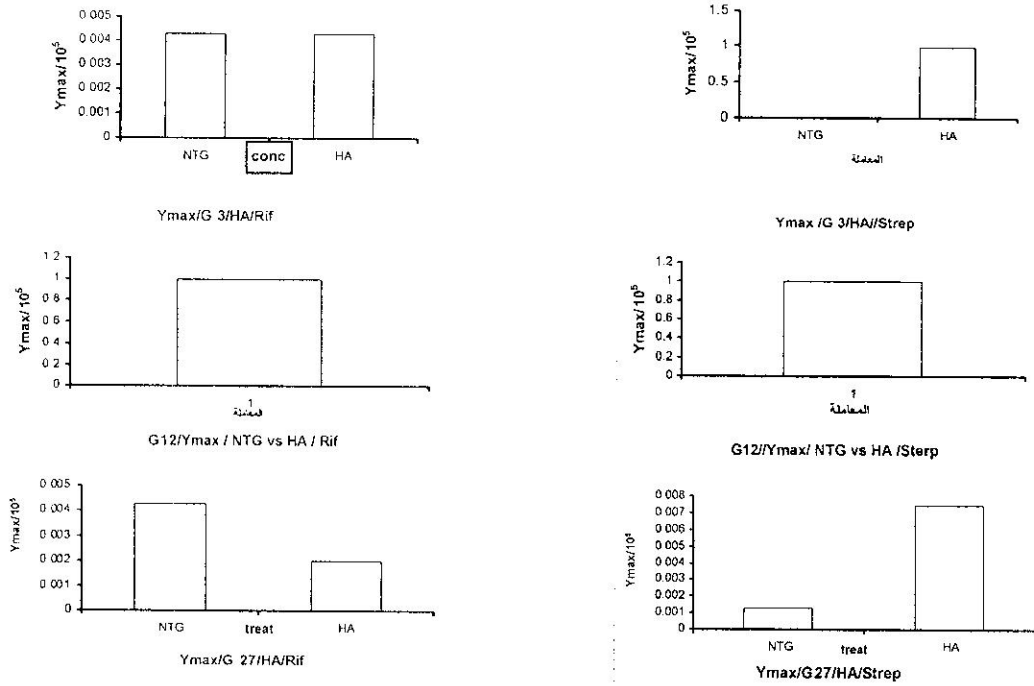
اما تاثر العزلة G_{27} بالمطفرين فيشير الى ان العزلة حساسة جدا بالمطفر NTG حيث ادى الى نقصان الجزء الحي من الخلايا الى حد كبير مقارنة بالمطفر HA اذ وصل التأثير للـ NTG الى حوالي ٥٤ مرة من تأثير HA. وباعتبار ان عمليات القتل وحث الطفرات احداث منفصلة (١٩) فقد تم تحديد عدد الطفرات/مللتر الناتجة من المعاملة بـ HA بتراكيز متدرجة ومقارنة ذلك بالمطفر NTG كمطفر قياسي كما موضح في (الشكل ٢). بالنسبة للعزلة G_3 وطفراتها المقاومة للستربتومييسين فيلاحظ ان HA تفوق في حث هذه الطفرات في حين انعكست الحالة بالنسبة للطفرات المقاومة للريفاميسين. وكان نمط التأثير متشابه في حالة العزلة G_{12} وكذلك بالنسبة للعزلة G_{27} حيث لم تحث أي طفرة مقاومة للريفاميسين في حالة المعاملة بالـ HA والملاحظ ان في التراكيز العالية سواء للـ NTG (بشكل عام) و HA يؤدي الى حصول انخفاض في عدد الطفرات المستحثة وذلك قد يعود الى ان التراكيز العالية تستمر في حث الطفرات ولكن الجديدة قد تكون طفرات مخمدة، وهذا ممكن بالنسبة للـ NTG الذي يعمل في الخلايا النشطة التي في حالة تضاعف حيث يؤثر على شوكات التضاعف (١٥)، وهذا ربما يدعم الاتجاه العام في عدم الركون الى استعمال نوع واحد من الخلايا لتحديد القابلية التطفيرية (١٦). والقابلية التطفيرية لمركب HA مسجلة في الزيادة الطردية لعدد الطفرات الراجعة لسلالات ايمس ولكن بكفاءات مختلفة، فاقصى كفاءة مسجلة في السلالة TA98 التي كانت بتراكيز ٢ نانومول في حين ان درجة الكفاءة في السلالة TA100 لم تصل الا باستعمال تركيز ٢١



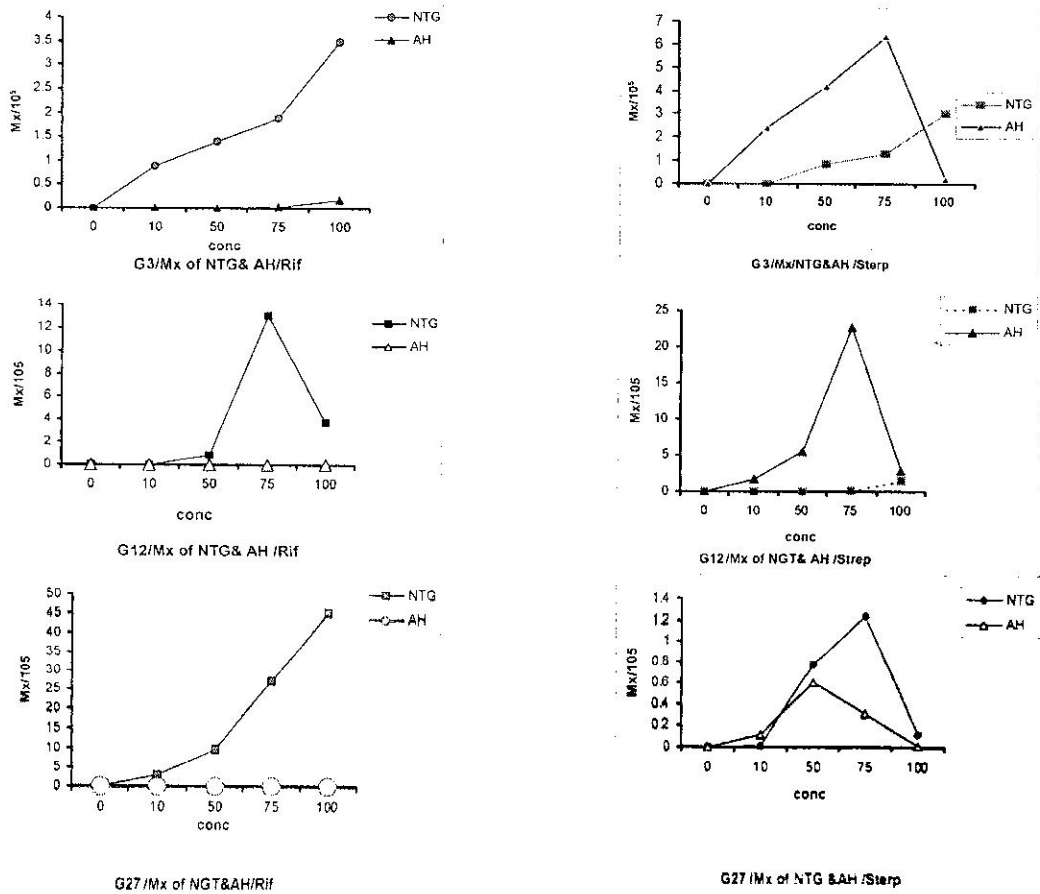
شكل 1 : تأثير المطفر HA على بقاء العزلات Sx والاهداف القاتلة Hx بتركيز متدرجة ومقارنة ذلك بالمطفر NTG



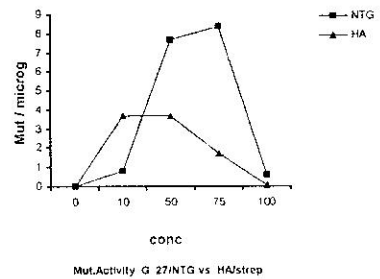
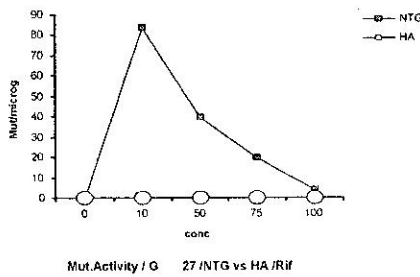
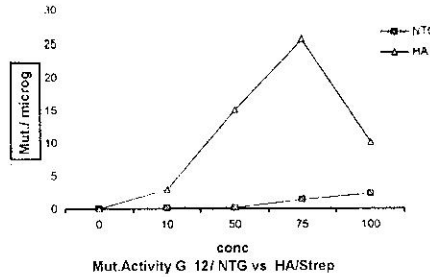
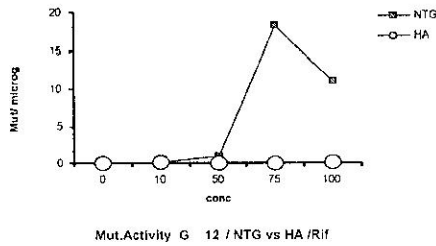
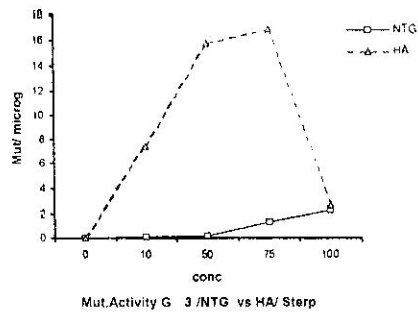
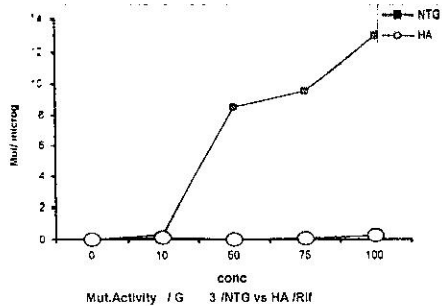
شكل 2 : عدد الطفرات المستحثة بتأثير HA و NTG



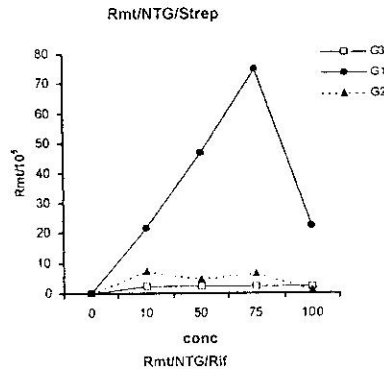
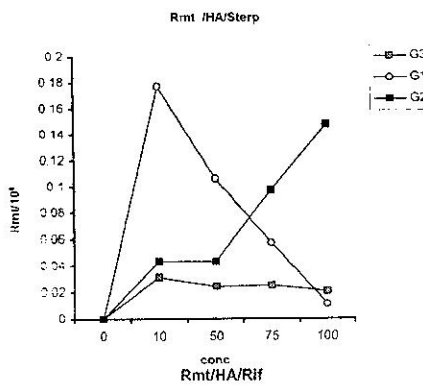
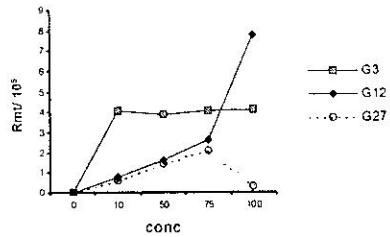
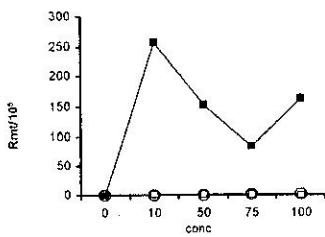
شكل 3 : تأثير HA على حاصل الطفرات التي يحدثها في العزلات المختلفة مقارنة بالمطر NTG



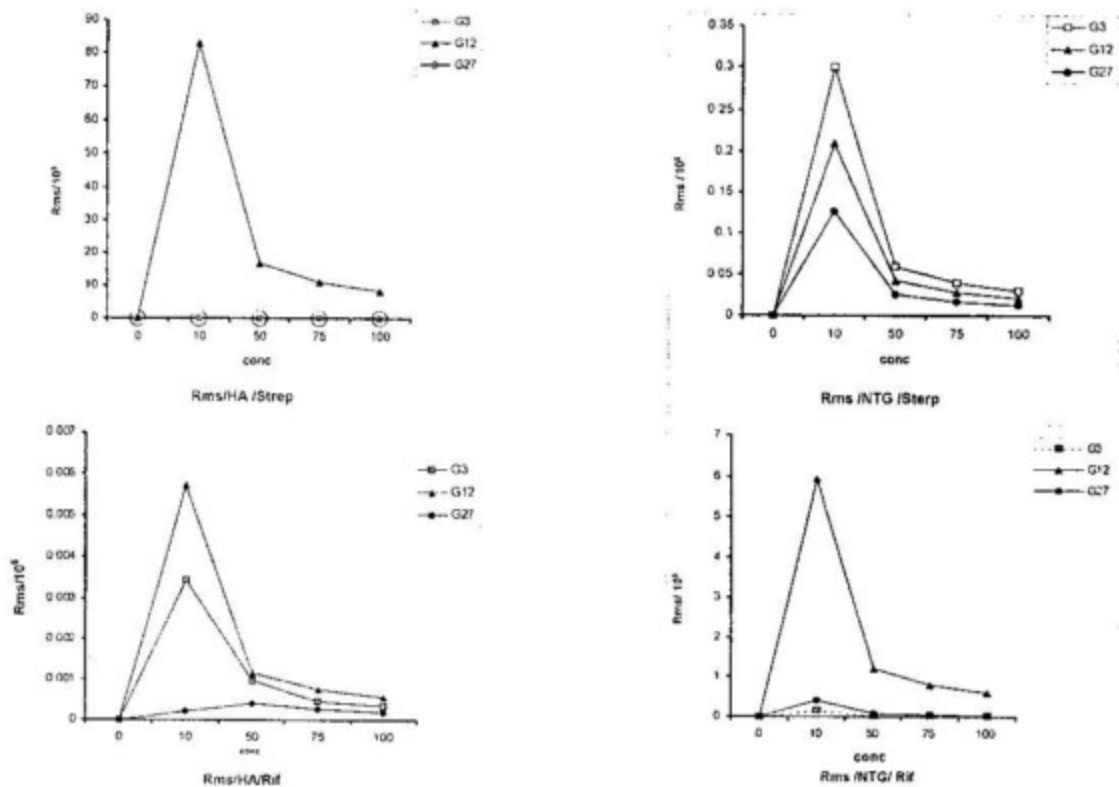
شكل 4 : تأثير HA على تردد (Mx) الطفرات في العزلات الثلاث ومقارنة ذلك بـ NTG



شكل 5 : كفاءة المطفر HA (طفرة / مايكروغرام) في حث الطفرات في العزلات الثلاث



شكل 6 : قابلية العزلات للتطير (Relative mutability) استجابة للمطفر HA ومقارنته بالـ NTG



شكل 7 : حساسية العزلات النسبية للتطهير (Relative mutational sensitivity) لتأثير HA ومقارنته بالـ NTG

References

1. Kier, L.D., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dankel, V., McCann, J., Mortelmans, K., P rival, M., Rao, T.K., & Ray, V. 1986. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 168:69-240.
2. Simmon, V.F. 1979. *In vitro* mutagenicity assays of Chemical Carcinogens & related compounds with *Salmonella typhimurium*. *J. Natl. Cancer Inst.* 62:893-899.
3. Song, P.S., Ou, C.N., & Tapley, J. 1981. Photoactivation of Furocoumaryl Carcinogens/Mutagens & their Interaction with Nucleic Acids. In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C. Felkner, Marcel Dekker: New York, Basel.
4. DeMarini, D.M., Pham, H.N., Katz, A.J., & Brockman, H.E. 1984. Relationships between structures & mutagenic potencies of heterocyclic nitrogen mustards (ICR compounds) in *Salmonella typhimurium*. *Mut. Res.* 136: 185-199.
5. Swenson, D.H. & Kadlubar, F.F. 1981. Properties of Chemical Mutagens & Chemical Carcinogens in Relation to their Mechanisms of Action. In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C. Felkner, Marcel Dekker: New York, Basel.
6. Nath, J. & Krishna, G. 1998. Safety screening of drugs in cancer therapy. *Acta Haematologica.* 99:138-147.
7. Watanabe, T. & Hirayama, T. 2001. Genotoxicity of soil. *J. Health Sci.* 47: 433-438.
8. Rao, K.S., Xu, Y., Shaw, M.S., & Parton, J. W. 2004. Mutagenicity testing applied for regulation of developing products. *Curr. Separations.* 20: 141-144.
9. Kilbey, B.J. 1981. Ultraviolet Mutagenesis: A Comparison of

- Mechanisms in *E.coli* & Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed.I.C.Felkner.Marcel Dekker:New York, Basel.
- 10.Felkner,I.C.,Laumbach,A.D.&Harter, M.L.1981.Development of a *B.subtilis* System to Screen Carcinogens/Mutagens:DNA-Damaging & Mutation Assays. In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed.I.C.Felkner.Marcel Dekker: New York,Basel.
- 11-Al-Azawi.G.L.,Al-Khafaji,Z.M.,Al-Mashadani,W.Y.&Al-Hassan,E.A. M.Developing of bacterial mutagenic assay system for detection of environmental & food mutagens. In press.
- 12.Coleman,D.C.Pomeroy,H.,Estridge, J.K.,Keane,C.T.,Cafferky,M.& Foster,T.J.1985.Susceptibility to antimicrobial agents & analysis of Plasmids in gentamicin & methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Dublin hospitals. J.Med.Microbiol.20:157-167.
- 13- Miller,J.H.1972.Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.New York.
- 14.Eckardt,F.&Haynes,R.H.1981.Quantitative Measures of Induced Mutagenesis. In "Short-Term Tests for Chemical Carcinogens"Eds.H.F. Stich & R.H.C.San.Springer-verlag: New York,Berlin.
- 15- Nestmann,E.R.1975.Mutagenesis by nitrosoguanidine,ethyl methanesulfonate,& mutatorgene mut H in Continuous cultures of *Escherichia coli*.Mut.Res .28: 323-330.
- 16- Felkner,I.C.(Ed.).1981.Microbial Testers:Probing Carcinogenesis.Marcel Dekker. New York.Basel.
- 17.Kuslikis,B.I.,Trosko,J.E.&Brashton, W.E.1991.Mutagenicity&effect on gapjunctional intercellular Communication of 4-4-methylenebis (2-Chloroaniline)&it's oxidized metabolites.Mutagenesis.6:19-24.
- 18- Kerszman,G.1975.Induction of mutation to Streptomycin resistance in *Micrococcus radiodurans* Mut. Res.28:9-14.
- 19-Ruiz-Vazquez.R&Cerda-Olmedo E.1980.An *Escherichia coli* mutant refractory to nitrosoguanidine mutagenesis.Mol.Gen.Genet.178:625-631.
- 20.McMahon,R.E.,Cline,J.C.&Thompson,C.Z.1979.Assay of 855 test Chemical in ten tester strains a new modification of the Ames test for bacterial mutagens.Cancer Res.39:682-693.
- 21- WHO.1985.Guide to Short-Term Tests for Detecting Mutagenic & Carcinogenic hemicals.Environmental Health Criteria 51.
- 22- Kuslikis, B.I. , Trosko, J.E. & Brashton , W.E. 1991. Mutagenicity and effect on gap junction hntercellular communication of 4-4- methylenebis (2- chloroaniline) and hts oxidized metabolites . Mutagenesis , 6 :19-24.
- 23 - Kersman , G. 1975. Induction of mutation to streptomycine resistance in *Micrococcus radiodurans* Mut. Res. 28 : 9-14 .
- 24- Ruiz- Vazquez , R. & Cerda- Olmedo , E. 1980. An *Escherichia coli* mutant refractory to nitrosoguanidine mutagenesis . Mol. Gen. Genet. 178 : 625- 631 .