تطوير نظام بكتري لتحديد المطفرات في البيئة والاغذية
رابعا: استعمال المطفرات المحورة هيدروكسيل أمين

زهرة محمود الخفاجي غيث لطفي العزاوي

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٥/٩/٦

الخـــلاصـــة

استعمل المـــطفر المحـــور Hydroxylamine (HA) لدراســـة استجابـــة عـــزلات G-system المكون من(*Bacillus*) G3 (*Arthrobacter*)G12 (*Brevibacterium*)G27 التي اعطت استجابة موجبة باستعمال المطفر القيياسي Nitorsoguanidine (NTG). عوملت العزلات بظروف وتراكيز متزايدة متشابهة بالنسبة للمطفرين.

اسفرت النتائج عن ان HA يؤدي الى خفض عدد الخلايا الحية المتبقية كما هو الحال مع NTG . حث HA طفرات مقاومة للستربتومايسين بشكل اكبر من NTG في حين كانت قدرته على حـــث طفـــرات مقاومة للريفامبسين بشكل اقل من NTG ، والذي انعكس بشكل مشابه على تردد الطفرات المستحثة. اما قابلية العزلات للتطفر Relative mutability فقد كانت العزلة G_{12} هي الاكثر قابلية ، وقد كانت العزلة نفسها الاكثر حساسية للاستجابة للمطفرين.

المقدمة

اثبتت العديد من الدراسات ان العلاقـــة وثيقة بين التطفير والتسرطن التـــي تحـــدث فـــي الانظمة الحيويـــة (١)، اذ وجـــد ان ٦٥% مـــن المسرطنات العضوية هي مواد مطفرة (٢) وقـــد وجد ان هناك اتفاقا كبيرا من الناحية النوعية بين قابلية المواد على التطفير والمواد المولدة للاورام (٣،٤).

وقد اصبح تحديد القابلية التطفيرية فـــي الانظمة البكترية اكثر قبولا كخطوة اولى لتحديـــد القابلية التسرطنية خاصة للمواد الجديدة (5) وذلك يعود الى ان الانظمة المايكروبيـــة هـــي انظمـــة حساسة ويمكن ان تؤدي الى حدس خطورة المواد المسرطنة (6) وتستخدم الانظمة المايكروبية فـــي تحديد المسممات الوراثية (Genotoxicants)في البيئة مثل التربة وكـــذلك تســـتخدم فـــي تحديـــد صلاحية الادوية المستعملة في علاج الســـرطان (7،٩،٨) ولعل اهم الانظمة الميكروبيـــة وعلـــى وجه الخصوص البكتريا هو اســـتعمال ســـلالات ايمس (١) او اســـتعمال ســـلالات خاصـــة مـــن *Echerichia coli* ، وتســـتعمل ايضـــا خميـــرة الخبـــز *Saccharomyces cerevisiae* (١٠). ونظرا لعدم وجود نظام واحد يمكن ان يكشف عن مواد مطفرة مختلفة (١١)،

اذ ان بعض المواد لم تثبت قابليتها للتطفير فـــي نظام ايمس *Salmonella typhimurium* ولكن امكن اثباتها باستعمال بكتريا *Bacillus* (١٢)، لذلك فالعمل مستمر على ايجاد العديد من الانظمة لتحديد المطفرات وذلك لاخذ صورة واضحة عن المواد المطفرة.

ويستهدف الجزء الحالي مـــن الدراســـة (والذي هو ضمن سلسلة من الدراسات) الكشـــف عن قابليـــة المطفـــر Hydroxylamine (HA) على النظام البكتري الذي اســـتعمل فـــي تحديـــد المطفرات الغذائية والبيئية (١١) ومقارنة ذلك مع عمليات التطفير التي يحدثها المطفـــر (NTG) Nitrosoguanidine .

المواد وطرق العمل

الاوساط الغذائية:

- وسط اكار اساس الدم Blood agar base من شركةEngland /Mast
- وسط المرق المغـــذي Nutrient broth مـــن شركة Germany/Merck
- محلول التخفيف ، استعمل 0.1 % من التربتون (Oxoid) في الماء المقطر.
- محلول داريء الفوسفات: حضر بتركيـــز ٠,٠٥ عياري وعدل الاس الهيدروجيني ٥,٥ باســـتعمال محلول عياري مـــن حـــامض الهيـــدروكلوريك (HCl).

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا/ جامعة بغداد/ العراق

المضادات الحيوية:

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

العزلات البكترية :

عزل عدد من البكتريا من نماذج تربة من مناطق بعيدة عن مصادر التلوث والمدن ، تم إجراء التخافيف اللازمة وزراعتها على وسط اكر أساس 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 الصبغة٢، ٣، ٤،٥، ٦، ٧ مللغرام /مللتر وحددت حساسية العزلات باستعمال طريقة الأقراص الورقية (١٤)

. **تحديد عدد البكتريا الحي (Viable count):** تم باستعمال الطرق المعتمدة في هذا المجال (١٥)

اختبارات التطفير :

تم تحضير مزروع لوغارتيمي للعزلات التي تم انتخابها في من وسط المرق المغذي الى كثافة ضوئية OD_{600} 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 الستربسومايسين والريفامبسين لتحديد الطفرات المقاومة . ثم حضنت النماذج بدرجة٣٧ 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 الستربتومايسين ، الريفامبسين (١٦، ١٧)

الحسابات :

أجريت الحسابات وفق المراجع الخاصة (١٩)

١. **تحديد الجزء الحي المتبقي** Survival fraction (Sx)

$$Sx = Ns/No$$

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 frequency** (Mx)

$$Mx = N_m x/No$$

$N_m x$ 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 للتطفير النسبية (Rmt)**Relative mutability**

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

٧. **حساسية التطفير 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* (G3) (G12) *Brevibacterium Arthrobacter* (G27) عزلت من التربة حساسة للستربتومايسين (١٠ مايكروغرام / ملليتر) والريفامبسين (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 النتروجينية حيث يؤدي الى ازالة مجموعة الامين من القاعدة النتروجينية Cytosineوبالتالي يحول زوج القواعد C=G

الى A=T (١٥) ويوضح (الشكل١) تاثير HA على مدى بقاء Survival fraction (Sχ) في الخلية ومقارنة ذلك بالمطفر القياسي NTG ، ويلاحظ ان العزلة G_3 قد بقى منها اعداد عند المعاملة بالمركب HA مقاربا للمعاملة بالمركب NTG. وقد تشابه تاثير HA وNTG 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 التاثير والذي يؤدي الى حث طفرات مخمدة Supperssor mutants وبالتالي يؤدي هذا الى الغاء العديد من الطفرات المميتة (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 التاثير للـ NTG الى حوالي ٥٤ مرة من تاثير 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 (الشكل٢). بالنسبة للعزلة G_3 وطفراتها المقاومة للستربتومايسين فيلاحظ ان HA تفوق في حث هذه الطفرات في حين انعكست الحالة بالنسبة للطفرات المقاومة للريفامبسين. وكان نمط التاثير متشابه في حالة العزلة G_{12} وكذلك بالنسبة للعزلة G_{27} حيث لم تحث أي طفرة مقاومة للريفامبسين في حالة المعاملة بالـ HA والملاحظ ان في التراكيز العالية سواء للـ NTG (بشكل عام) وHA 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 بتركيز ٢ نانومول في حين ان درجة الكفاءة في السلالة TA100 لم تصل الا باستعمال تركيز ٢١ نانومول (٢٠) كما لايستبعد ان تكون للعزلة G_{12} وG_{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) .

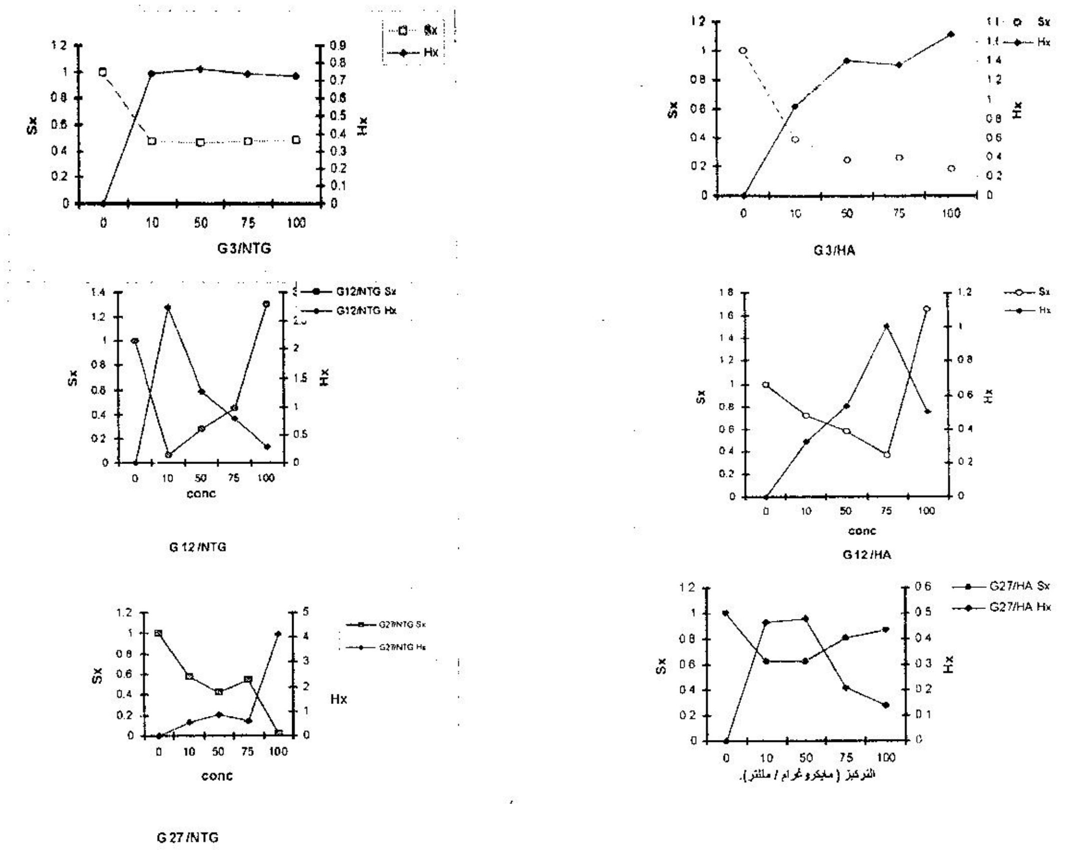
من مؤشرات كفاءة المطفرات هو حاصل الطفرات mutant yield (Yχ) لذلك حسب Ymax (وهو حاصل الطفرات عند اقل تركيز) لمقارنة كفاءة اداء كل من المطفرين في عزلات النظام كما موضح في (الشكل٣) ومقارنة ذلك بكفاءة NTG عند تركيز ١٠ مايكروغرام/مللتر، وتوضح النتائج ان كفاءة HA في حث طفرات مقاومة للستربتومايسين اكثر من NTG .

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 هنان 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 السايتوزين (كما ذكر انفا) والتي قد تكون هذه المناطق (الخاصة بالتشفير لانزيم RNA Polymerase) قليلة المحتوى في هذه القاعدة النتروجينية. والاختلاف في تاثير HA مسجل في سلالات ايمس كذلك كما في السلالات TA100,TA98 (١، ٢٠).

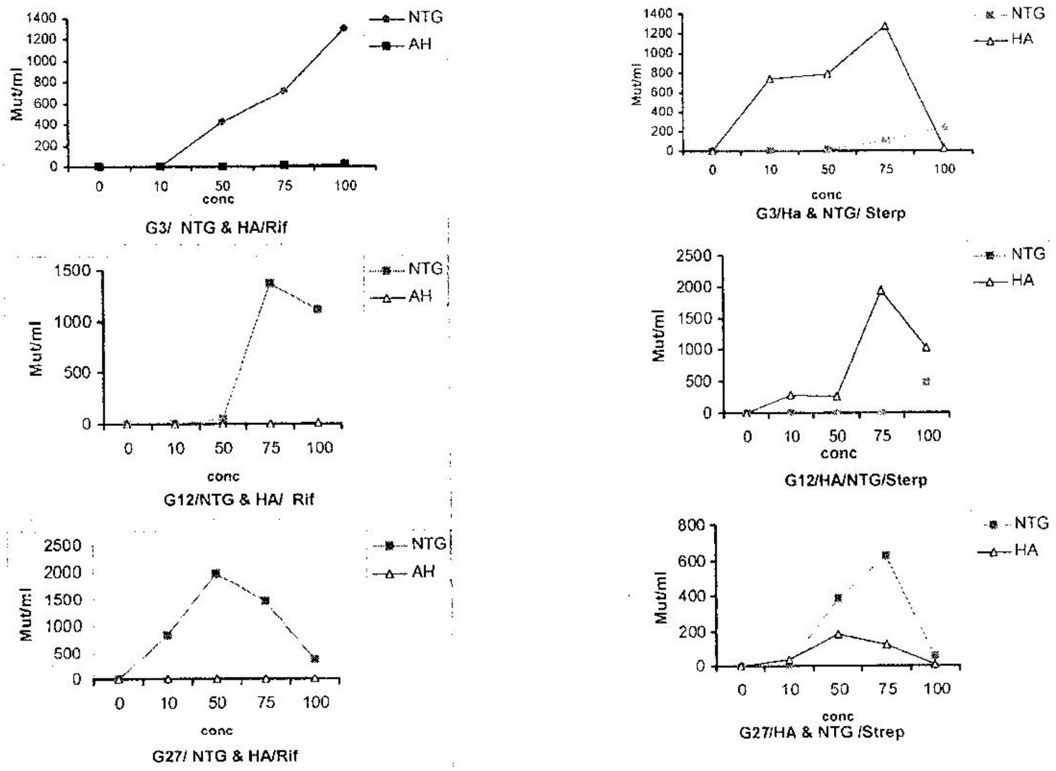
ولعل الصورة تصبح اكثر وضوحا بقياس او حساب كفاءة المطفر والتي تمثل عدد الطفرات المستحثة للوحدة الوزنية كما موضح في (الشكل٥) ومرة اخرى يلاحظ ان HA كفاءة في حث طفرات المقاومة للستربتومايسين ولكن ليس للريفامبسين.

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

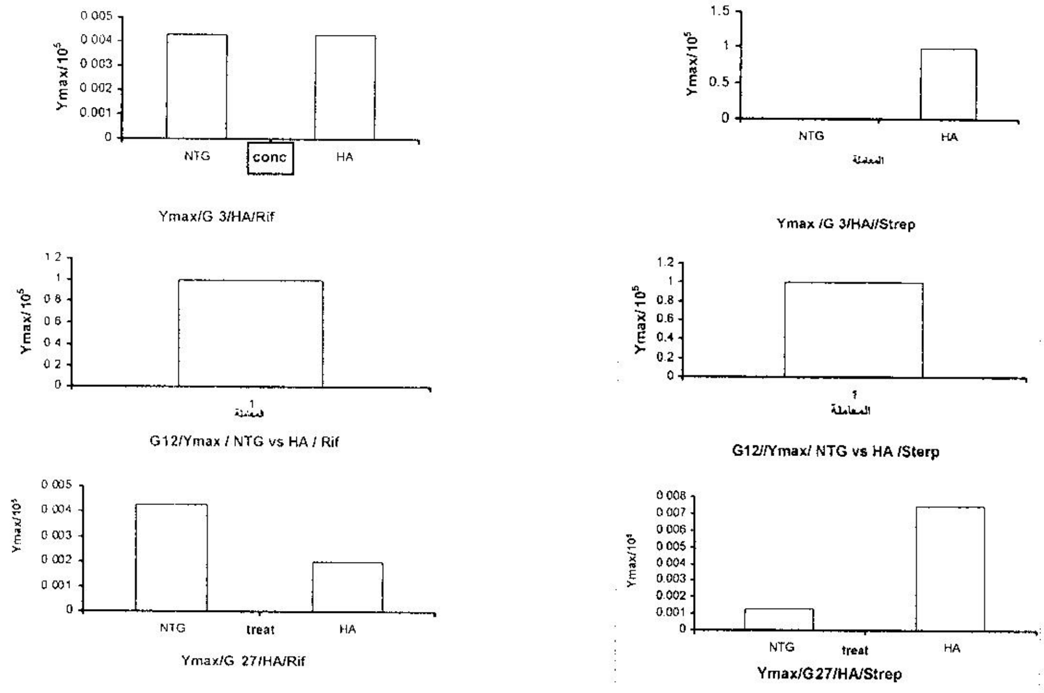
اما حساسية العزلات للتطفير بالمطفرات وقياس Relative (*Rms*) mutational sensitivity موضحة في (الشكل٧) ويتضح ان العزلة G_{12} هي الاكثر حساسية وهذا يتفق مع كون العزلة هي الاكثر قابلية للتطفر (١٦).



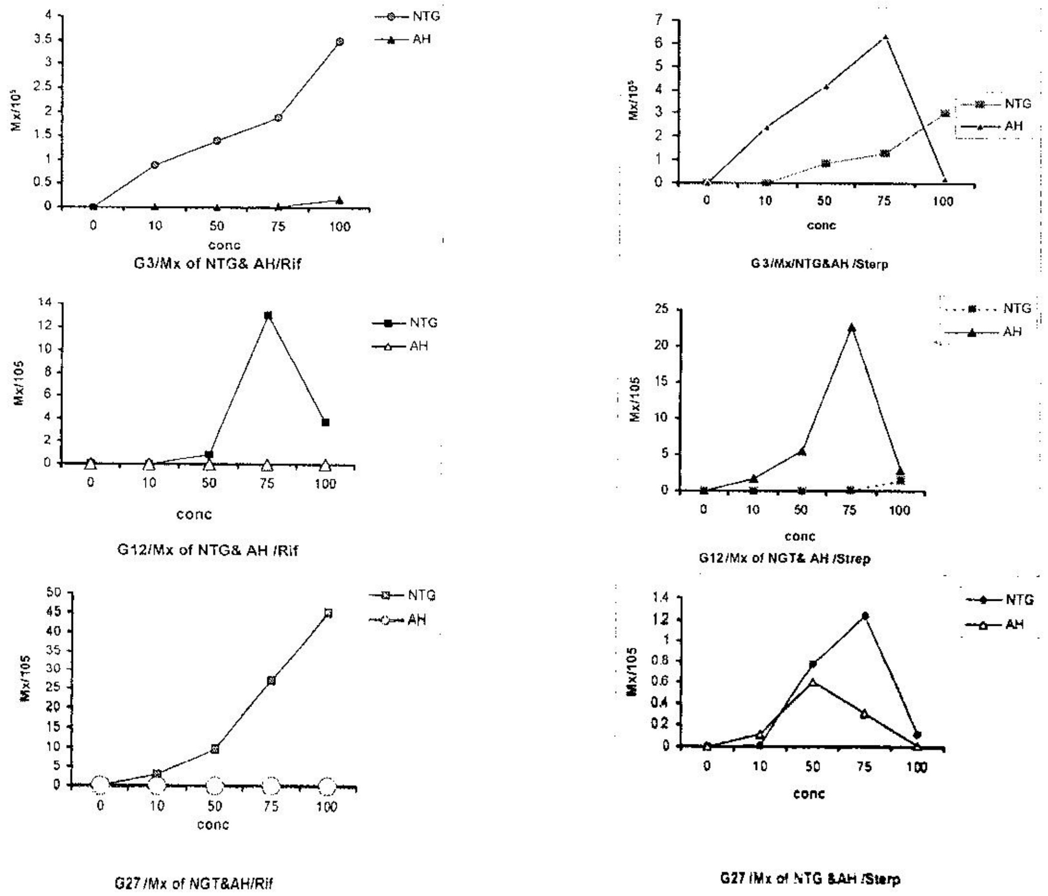
شكل 1 : تأثير المطفر HA على بقاء العزلات Sx والاهداف القاتلة Hx بتراكيز متدرجة ومقارنة ذلك بالمطفر NTG



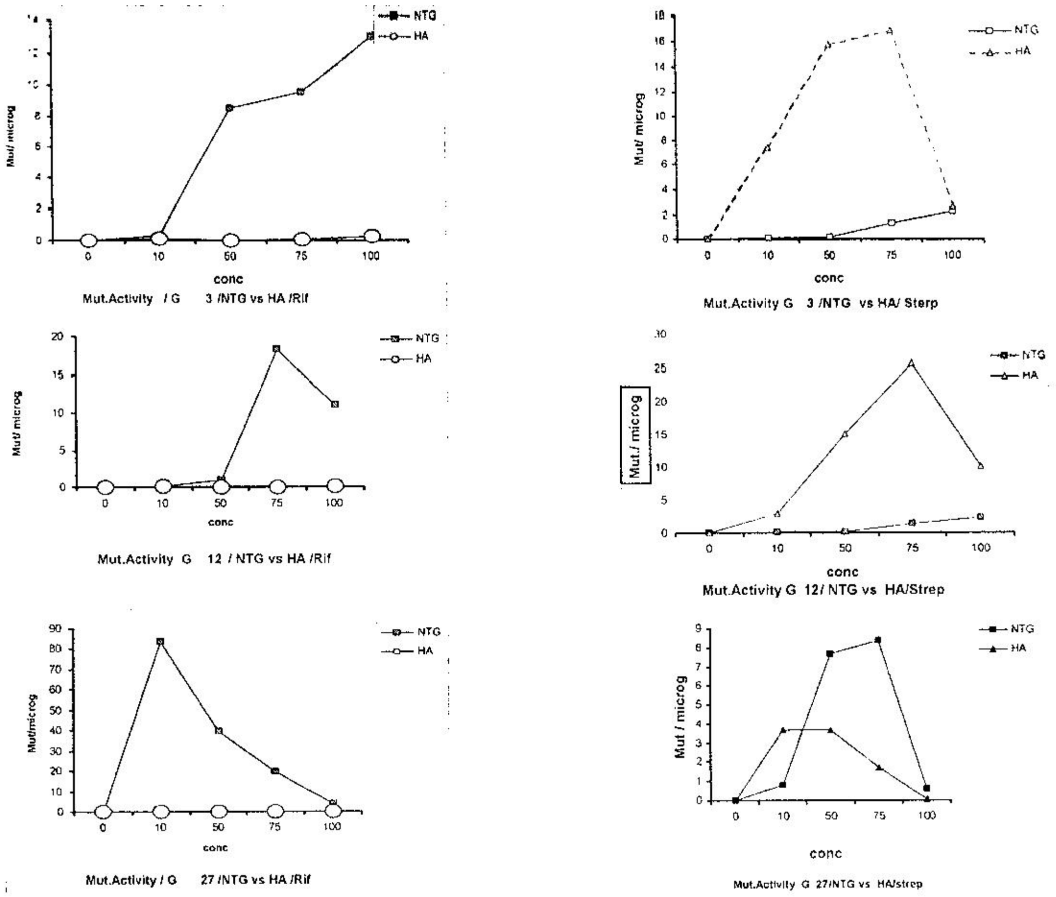
شكل : 2 عدد الطفرات المستحثة بتأثير HA وNTG



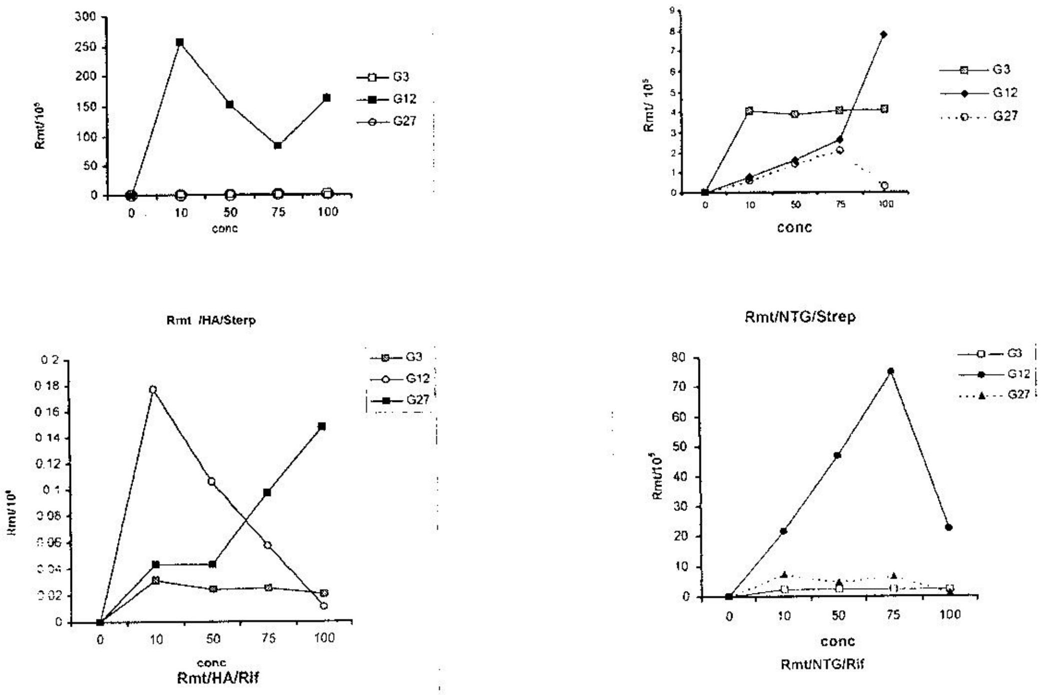
شكل : 3 تأثير HA على حاصل الطفرات التي يحثها في العزلات المختلفة مقارنة بالمطفر NTG



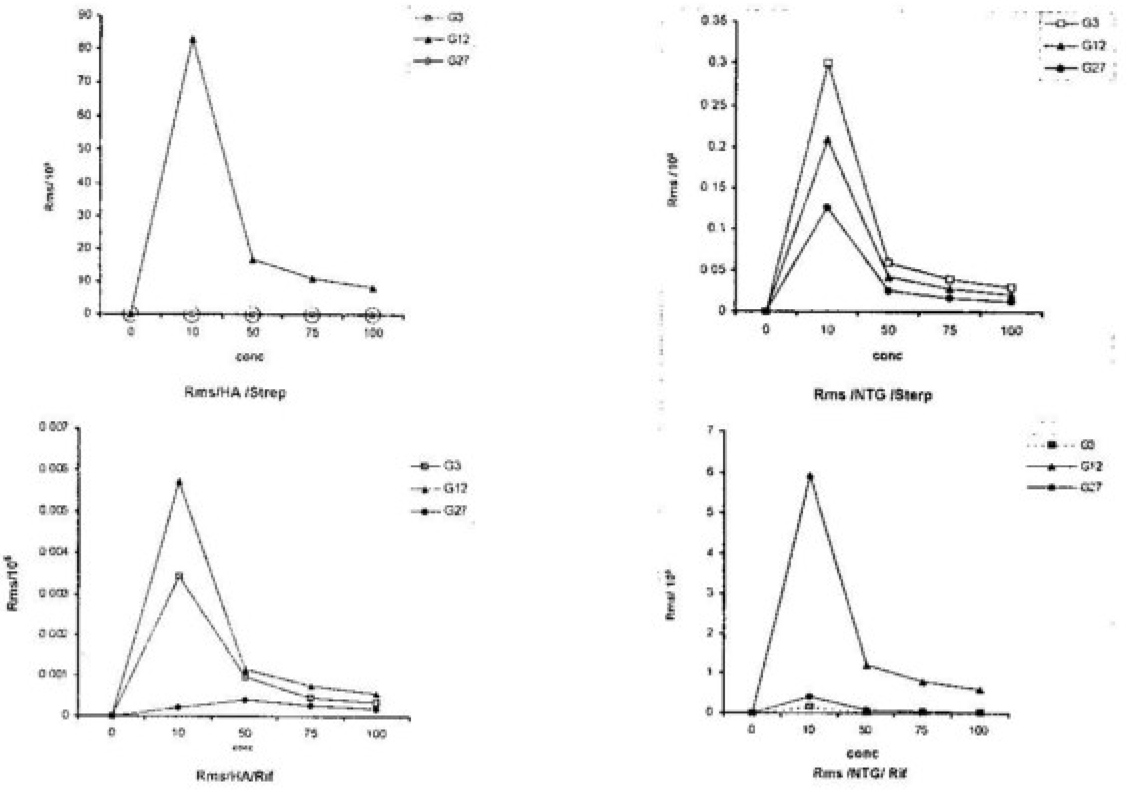
شكل : 4 تأثير HA على تردد (Mx) الطفرات في العزلات الثلاث ومقارنة ذلك بـ NTG



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



شكل : 6 قابلية العزلات للتطفير (Relative mutability) استجابة للمطفر HA ومقارنته بالـــ NTG



شكل : 7 حساسية العزلات النسبية للتطفير (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.*Invitro* utagenicity assays of Chemical Carciniogens & 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 structares & mutagenic potencies of heterocyclic nitrogen mustards (ICR compounds) in *Salmonella typhimurium*.Mut.Res.*136*: 185-199.

5.Swenson,D.H.&Kadlubar,F.F.1981.P roperties of Chemical Mutagenes & Chemical Carcinogens in Relation to their Mechanisms of Action.*In* "Microbial Testers:Probing Carcinogeneis" 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.Gen otoxicity 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/Mutagenes: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.Mutagensis 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 Carcinogensis.Marcel Dekker. New York.Basel.

17.Kuslikis,B.I.,Trosko,J.E.&Braslton, 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 rediodurans* 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. & Braslton , W.E. 1991. Mutagenicity and effect on gap junction hntercelluar 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 .

Developing of Bacterial Mutagenic Assay System for Detection of Environmental and Food Mutagens IV – Mutagenesis with Modifying Mutagens Hydroxylamine

Zahra M. Al-Khafaji **Gaith L. Al-Azawi**

Genetic Engineering of Biotechnology Institute for Postgraduate Studies/University of Baghdad/ IRAQ.

Abstract

Modifying mutagen, Hydroxylamine (HA) used to study the response of isolates in G-system which is composed of three isolates G_3 (*Bacillus*),G_{12} (*Arthrobacter*) and G_{27} (*Brevibacterium*). The isolates were treated with HA at increasing concentrations under similar conditions used for treatment with NTG.

Results indicated that HA led to reduce the survival fraction of the three isolates as in NTG treatment. HA induced streptomycin resistant mutants at higher level than NTG, but this was not true for rifampicin resistant mutant. This manner reflected on the induced mutant frequency. The relative mutability by HA was recorded for G_{12} & this isolate was the most sensitive toward both mutagens.