# الكشف عن القابلية التطفيرية لبعض المواد وباستعمال نظام تطفير بكتيري

زهرة محمود الخفاجي* غيث لطفي العزاوي** الهام عبد الهادي خلف**

تاريخ قبول النشر ٥/ ١٠/ ٢٠٠٥


## الخلاصة

اختبرت الفعالية التطفيرية لبعض المواد المستخدمة لاغراض مختلفة باستخدام نظام تطفير بكتيري G-system المكون من ثلاث عزلات بكتيرية تعود لاجناس مختلفة $G_3$ (*Bacillus* spp) ، $G_{12}$(*Arthrobacter* spp) ، $G_{27}$ (*Brevinbacterium* spp) . وشملت المواد المختبرة دواء بريكتين (المادة الفعالة Cyproheptadine ) ومركب ثنائي الاستيل ومادة التوين ٨٠ ، استعملت المواد بتركيزين ١ او ١٠٠% مايكروغرام/مللتر .

اوضحت النتائج ان مادة البرياكتين هي مطفرة حيث حثت طفرات مقاومة للستربتومايسين والريفامبسين من بعض العزلات سواء بقياس حاصل الطفرات وترددها وكذلك الحال كان مع مركب ثنائي الاستيل. اما التوين ٨٠ فقد حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين من العزلة الحساسة جدا ($G_{12}$) ، وكذلك حث المركب طفرات مقاومة للستربتومايسين الى حد ما في العزلة $G_{27}$.


## المقدمة

تشكل العلاقة بين التطفير والتسرطن الاساس في استعمال العديد من انظمة التطفير قصيرة الامد (1) بالرغم من ان هذه الانظمة وخاصة البكتيرية تكشف عن المواد السامة الوراثية (Genestoxic)(2) وذلك يعود الى ان المطفرات ومعظم المسرطنات تغير الدنا DNA وبما ان جميع الاحياء مادتها الوراثية مكونة من اشرطة مزدوجة وبتكرار من القواعد النتروجينية الاربعة المعروفة ، وعليه فان أي كائن حي يمكن يستعمل كنظام دليل لتحديد المطفرات (٣). وزاد الاهتمام بالانظمة قصيرة الامد وذلك لكونها سريعة وغير مكلفة (4) كما انها تكون ملائمة لتوافق الزيادة الكبيرة في المواد المسرطنة والتي تحتاج الى انظمة سريعة لاختبارها ، والبكتريا تمثل انظمة ملائمة في مثل هذه الحالة نظرا للعديد من مواصفاتها الملائمة ( 3)،اذ اشارت العديد من الدراسات الى ترابط وثيق بين التسرطن والتطفير وموت البكتريا(1) .

وقد زاد استعمال الانظمة قصيرة الامد من تحديد صلاحية الادوية المستعملة لعلاج السرطانات (٦،٥) وكذلك تستخدم في الكشف عن الملوثات من التربة والبيئة ( 7) .

وقد تم تصميم نظام للكشف عن المطفرات مكونة من ثلاث عزلات بكتيرية ( 8) ، واستعملت في هذه الدراسة للكشف عن القابلية التطفيرية لبعض المواد النقية المستعملة لاغراض مختلفة وشملت البرياكتن وتوين ٨٠ وثنائي الاستيل ، وكذلك درس المستخلص الخام لثلاثة نباتات وهي الرشاد والجرجير من العائلة الصليبية واستعمل عصير الجزر كمعاملة مقارنة .

## المواد وطرق العمل

ثنائي الاستيل Diacetyl من شركة Fluka

البرياكتين : الحاوي على المادة الفعالة Cyproherptadine من شركة India/Ajana

Tween 80 : من شركة England/BDH

اما باقي المواد فهي كما موضحة في دراسة سابقة (8) نظام التطفير مكون من ثلاث عزلات $G_3$ ، $G_{12}$ ، $G_{27}$ حساسة للستربتومايسين (١٠ مايكروغرام/ مللتر) والريفامبسين(٢٠ مايكروغرام/مللتر) (8) .

اما المواد النقية وهي Cyproheptadine ، توين ٨٠ وثنائي الاستيل فاستعملت بتركيزين ١ مايكروغرام/ مللتر المستعمل للمطفرات القوية و ١٠٠ مايكروغرام/ مللتر المستعمل للمطفرات الضعيفة (١٠) وعوملت الخلايا كما مذكور في دراسة سابقة (٩،٨).

## النتائج والمناقشة

العزلات المستعملة في الدراسة هي موجبة لصبغة كرام لتلافي مشكلة النضوحية التي تشكل عائقا متاصل في البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل بكتريا *Salmonella typhimurium* و *Escherichia coli* (12,11). وقد استعملت

* د./ معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق

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

المؤشـــرات الوراثيـــة Genetic markers المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين باعتبارهـا مــن الصــفات الكروموســومية فـي معظـم البكتريا (١٣).

**البرياكتين :**

يوضح (الشكل١) تاثير التركيـزين ١و١٠٠ مايكروغرام من البرياكتين على الجـزء المتبقي من الخلايـا Survival fraction (Sχ) وما يقابلها من الاهداف القاتلة في الخلية Lethal hits (Hχ) (١٤) للعزلات الثلاث. وتؤدي العديد من المواد الى قتل الخلايا ولكـن هـذه احـداث مستقلة عن عمليات التطفيـر ولكـن لابـد مـن دراستها بشكل مبدئي لتوضيح الصورة عن تاثير المواد فقد تكون سامة . ويلاحظ ان المادة قليلـة التاثير على عيوشية الخلايا ماعدا العزلـة $G_3$ اذ كان ٠,٤ بتركيز ١ مـايكروغرام وزاد الجـزء المقتول بتركيز ١٠٠ مايكروغرام ووصـــل χ S الى ٠,١٠٢ .

اما التاثير المطفر فموضح في (الشـكل 2) ويلاحظ ان العزلـة $G_3$ التـي عانـت مـن عمليات قتل كبيرة (شكل١) استحثت فيها الطفرات بمستويات اقل من العزلات الاخرى. اما العزلـة $G_{12}$ والتي كانت اكثر العزلات حساسـية (٩،٨) فكانت الطفرات المستحثة فيها اكبر مـن البقيـة بالنسبة للطفرات المقاومة للستربتومايسين وتليهـا العزلة $G_{27}$ ، وينعكس الحال بالنسبة للطفـرات المقاومة للريفامبسين. اما (الشكل٣) فيوضح كفاءة البرياكتين والتي تتمثل بحساب حاصل الطفـرات Y χ (١٤) والذي مثـل انسـحابا للنتـائج فـي (الشكل٢). اما كون المادة مطفرة فيتحقق ذلك من حساب تردد الطفرات (M χ) بزيـادة التراكيـز وهذا موضح في (الشكل٤) ويلاحـظ ان المـادة مطفرة بالنسبة للعزلة $G_{12}$ , $G_{27}$ عند اسـتعمال الستربتومايسين كمؤشر وراثي وكان كذلك بالنسبة للعزلات $G_3$ , $G_{27}$ عند اسـتعمال الريفامبسـين كمؤشر وراثي.

والحقيقة ان المقاومـة للستربتومايسـين يمكن ان تستعمل كمؤشـر للتطفيـر وذلـك لان الطفرات المقاومة للستربتومايسين تنتج من تغيـر في احد البروتينات الرايبوزوميـة ولـذلك فهـي طفرات خاصة ، اما عند انتاج بروتين غير كامل في هذا الموقع فان الطفرات تكون مميتة لـذلك فهي لاتصلح ان تستعمل في تحديد التاثير المطفر لبعض المطفرات (٣). اما طفرات الريفامبسـين فان المقاومة تنتج من التاثير علـى الوحـدة β لانزيم كـوثرة RNA (RNA polymerase) (١٥). ولكن من ناحية اخرى يلاحظ ان الانـزيم الفعال مكون من اربعة وحدات هي χ 2 ، β ،β ولذا يتوقع ان يكون التاثير على أي منها يمكن ان تؤدي الى عدم تجمع الانزيم وبالتالي التاثير على الصفة (١٦) ولكن العديد من الاحياء لها وسـائل اصلاح لموادها الوراثية وبالتالي ينخفض ظهـور الطفرات فيها (١٧).

والمادة الفعالة في هـذا الـدواء هـي Cyprohepatidine التي صنفت ضمن بـرامج EPA ضمن الصنف ٣٠ والتي تشير الدراسات المسحية التي اجريت في هـذا المجـال (١٢) ان هذه المادة لم تعط مؤشر واضح حول كون المادة مطفرة ام لا ( SALT) في سـلالات ايمـس TA1535 ، TA1537 ، TA1538 سـواء باستعمال نظام التنشيط Sa ام لا. ولـذلك فـان النتائج اعلاه تشير الى ان المادة مطفـرة وهـذا يتوافق مع توصيات الجهات المسؤولة مـن انـه لايجب الاعتماد على استعمال نـوع واحـد مـن انظمة التطفير لانه وجد ان المواد سالبة التـاثير في سلالات ايمس كانت موجبة في الفحوص التي استعملت فيها *B acillus subtilis* ، وهذا يعني انه لا يوجد نظام واحد يكشف عن كل المطفرات (١٨،١٩) .

**ثنائي الاستيل :**

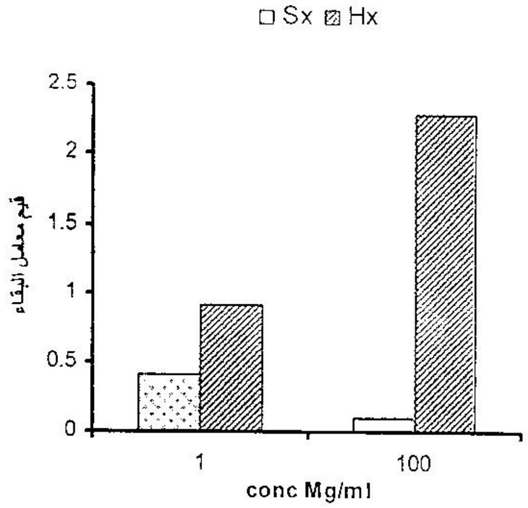
من مركبات النكهة في منتـوج الزبـد (٢٠) ويوضح (الشكل٥ ) تاثير المركب بتركيزين ١و ١٠٠ مايكروغرام / مللتر على المتبقي فـي الخلايا ( Sχ) وما يقابله من (Hχ) ويلاحظ ان المركب اثر على العزلات الثلاثة بشكل مقـارب لتاثير البرياكتين المذكورة في (الشكل١).

اما قدرة المركب على حث الطفـرات/ مللتر للعزلات الثلاث موضحة فـي (الشـكل٦) ويلاحظ ان العزلة $G_{12}$ هي الاكثر حساسية مـن حيث حث الطفرات المقاومة للستربتومايسـين او الريفامبسين وتليها العزلة $G_3$ واقل من ذلك فـي العزلة $G_{27}$ ، وقد انعكس ذلـك علـى حاصـل الطفرات (Y χ) الموضح في (الشـكل٧ ). امـا تردد الطفرات ( M χ) (شكل٨) والـذي فيـه تنسب عدد الطفرات لعدد الخلايا فـي نمـوذج المعاملـة الضـابطة فـيلاحظ ان العزلـة $G_{12}$ تراجعت نظرا لارتفاع عدد الخلايا الحـي بعـد المعاملـة وتـرك الخلايـا للتعبيـر الظـاهري (Phenotypic expression) وذلك لان المقاومة للمضادات الحيوية يحتاج الى مثل هـذا التعبيـر (١١) وهذا يتفق مع تاثير ثنائي الاسـتيل علـى سـلالات ايمـس TA97 ، TA98 ، TA100 (٢١) ، وقد كانت العزلات مختلفة الاستجابة كما

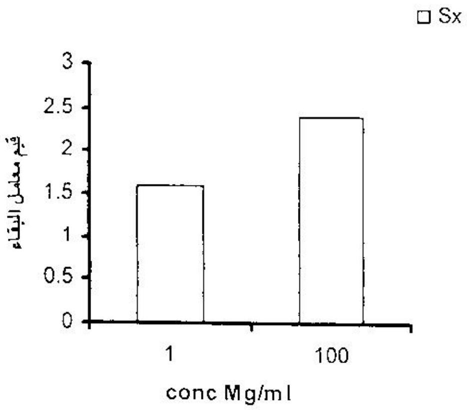
هو الحال مع البكتريات المستعملة في هذه الدراسات .

**توين ٨٠ :**

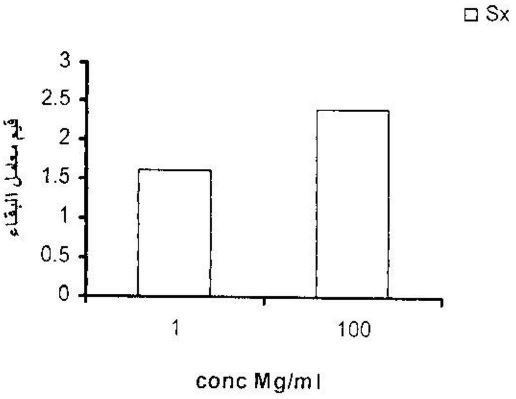
من المواد الاساسية لنمو بعض انواع البكتريا العائدة لمجموعة بكتريا حامض اللاكتيك ، كما انها تستعمل في بعض الادوية والاغذية بالاضافة الى استعمالها كمادة خافضة للشد السطحي في النطاق الدراسي. وتاثير المادة على الجزء المتبقي من الخلايا في عزلات الدراسة الحالية موضحة في (الشكل٩) ، ويلاحظ ان العزلة $G_{12}$ هي الاكثر تاثرا حيث انخفض الجزء المتبقي منها عند ازدياد تركيز التوين الى ١٠٠ مايكروغرام بينما تاثرت العزلتين الاخرتين بمستوى اقل. اما من حيث حث الطفرات (شكل١٠) فيلاحظ اختفاء الطفرات في العزلة $G_3$ مما يشير الى ان للمركب تاثير سام للخلايا (٢٢) ، في حين كان المركب الاكثر تاثيرا كمطفر في العزلة $G_{12}$ التي هي اكثر العزلات حساسية. اما تاثير المركب على العزلة $G_{27}$ فقد ادى الى حث عدد كبير من الطفرات المقاومة للستربتومايسين وانعدام ذلك بالنسبة للريفامبسين ، وكفاءة التوين ٨٠ $(Y\chi)$ موضحة في (الشكل١١) وكان للمركب قوة حاثة عالية في العزلة $G_{12}$ سواء بالنسبة للطفرات المقاومة للستربتومايسين او الريفامبسين. اما اعتبار التوين ٨٠ مادة مطفرة فتقاس بحساب تردد الطفرات في الخلايا الحية ومدى زيادة هذا التردد بزيادة التراكيز وهذه موضحة في (الشكل١٢) ويلاحظ ان هذا يتحقق في العزلة $G_{12}$ بالنسبة للمضادين ولكنه لايكون كذلك بالنسبة للعزلتين $G_3$ , $G_{27}$ وهذا يتفق مع القاعدة المستعملة في هذا المجال وهو ان اختبار القابلية التطفيرية لمادة معينة لايعتمد على نوع واحد من انظمة الاختبار وانما يجب ان يتم باستعمال انواع بكتيرية مختلفة ، كما انه لايوجد نظام واحد يمكن ان يكشف عن كل انواع المواد المطفرة (٢،١٢،٢٣،٢٤)




G3/ البرياكتين /Sx vs Hx

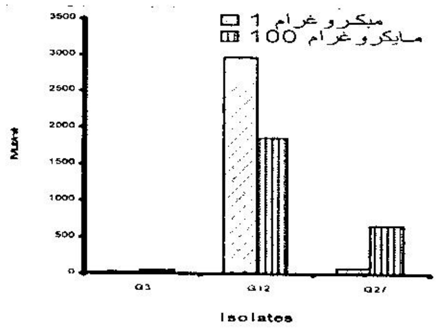



G12/ البرياكتين / Sx vs Hx

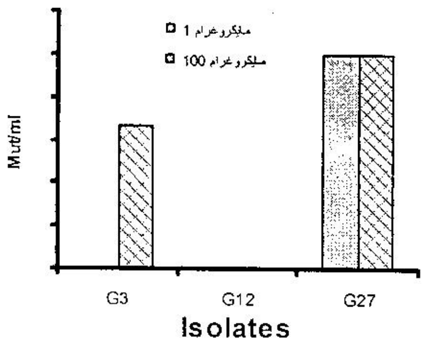



G27/ البرياكتين / Sx vs Hx

**شكل ١ : تأثير تراكيز مختلفة من البرياكتين على الجزء المتبقي من الخلايا Sx**

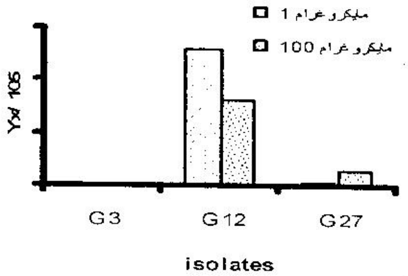



Piractin/ Strep

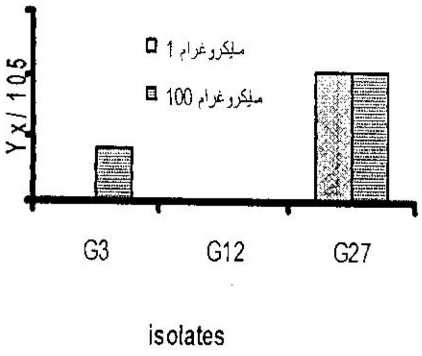



Piractin / Rif

شكل ٢ : عدد الطفرات المستحثة / مللتر بتأثير البرياكتين / ١او١٠٠ مايكروغرام

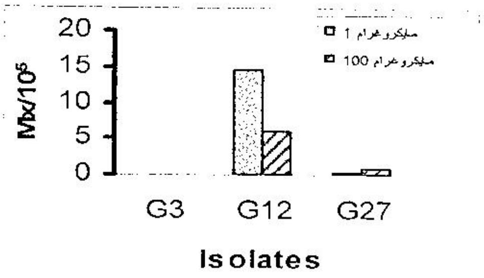



Yx/Strep/ Priacrtin

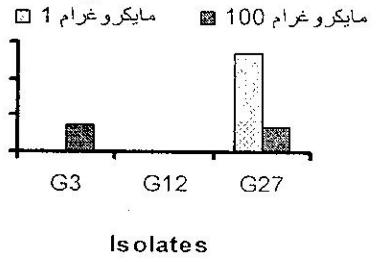



Yx/ Rif/ Priactin

شكل٣ : حاصل الطفرات Yx عند استعمال تراكيز مختلفة من البرياكتين

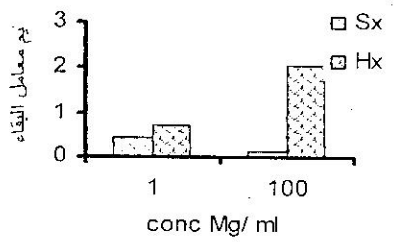



Mx/Sterp/Priactin

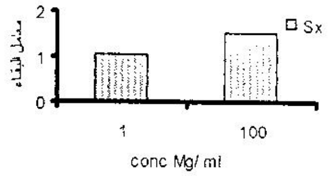



Mx//Rif/Priactin

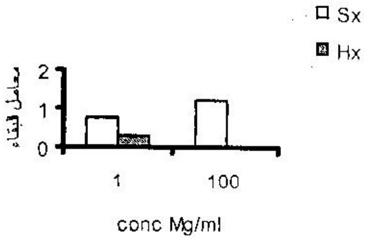
شكل ٤ : تردد الطفرات Mx المستحثة بالبرياكتين في العزلات الثلاث




G3/ Sx vs Hx / Diacetyl

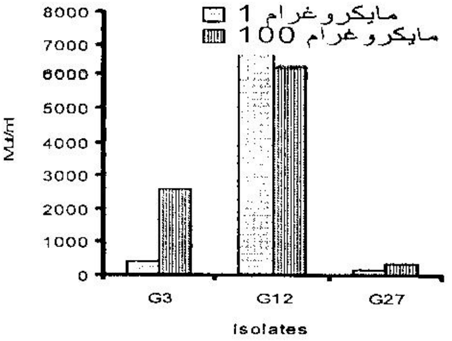



G12/Sx vs Hx / Diacetyl

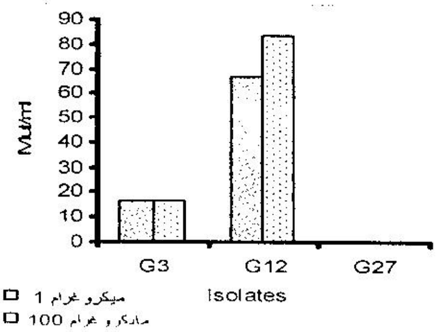



G27/ Diacetyl / Sx vs Hx

شكل ٥ : تأثير تراكيز مختلفة من ثنائي الاستيل على الجزء المتبقي من الخلايا Sx

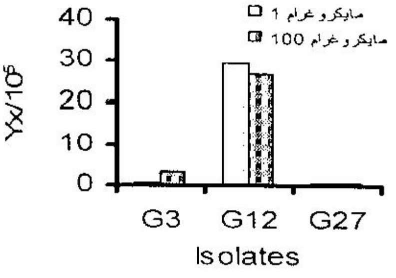


Diacetyl/ Strep

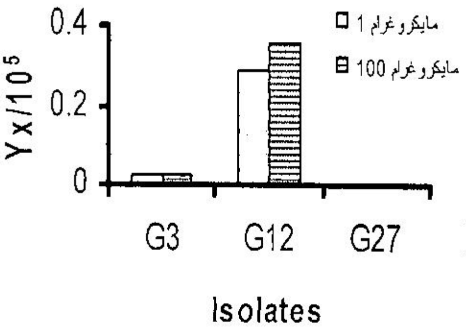


Diacetyl /Rif

شكل ٦: تأثير ثنائي الاستيل على حث الطفرات المقاومة للعزلات الثلاث

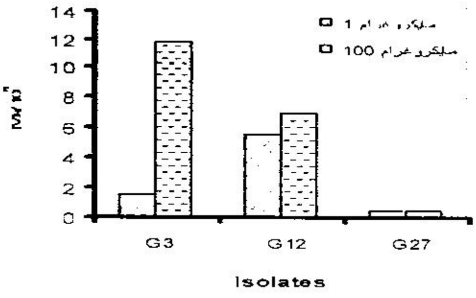


Yx/ Strep/Diacetyl

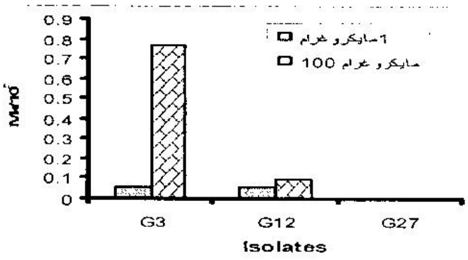


Yx/Rif/ Diacetyl

شكل٧: تأثير ثنائي الاستيل على حاصل الطفرات Yx للزعلات الثلاث بتركيز ١، ١٠٠ مايكروغرام

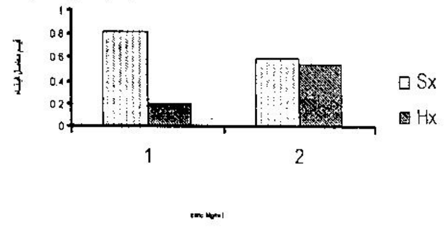


Mx/Sterp/Diacetyl

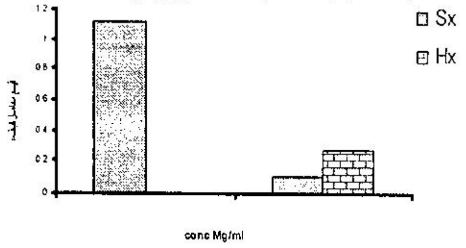


Mx/Rif/ Diacetyl

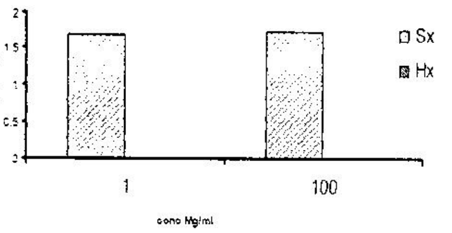
شكل٨: تردد الطفرات المستحثة بثنائي الاستيل بتركيز ١و ١٠٠ مايكروغرام



G3/ Sx vs Hx /Tween

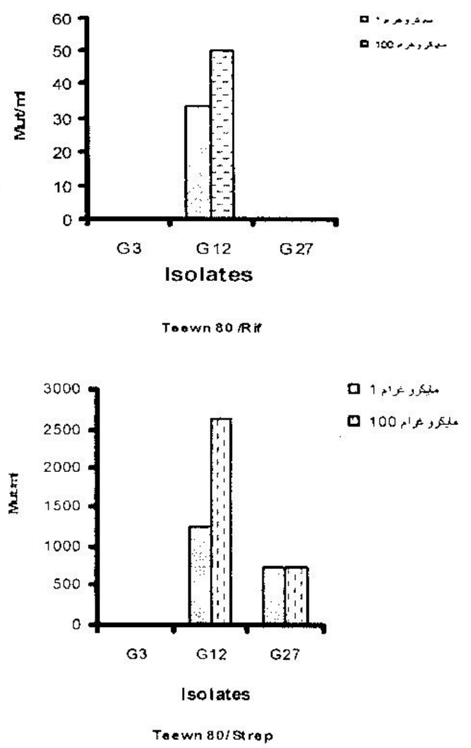


G12/Tween / Sx vs Hx

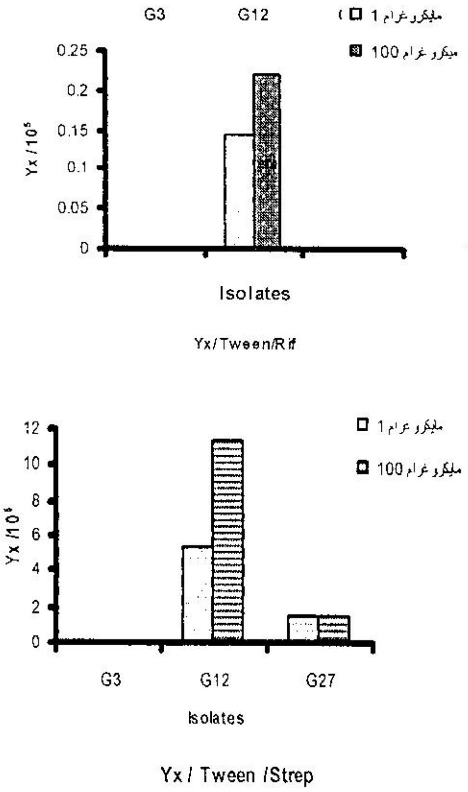


G27 / Sx vs Hx / Tween 80

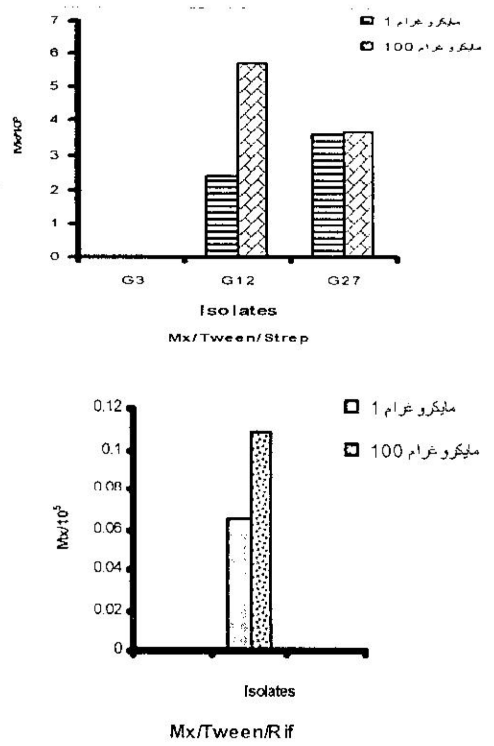
شكل٩: تأثير التوين ٨٠ على الجزء المتبقي من الخلايا Sx وما يقابلها من Hx




شكل ١٠ :تأثير التوين ٨٠ على حث الطفرات / مللتر بتراكيز ١، ١٠٠ مايكروغرام على العزلات




شكل ١١ : تأثير تراكيز مختلفة من التوين ٨٠ على حاصل الطفرات Yx




شكل ١٢ : تأثير التوين ٨٠ على تردد الطفرات Mx في العزلات المستعملة

## References:


1. Song,P.S.,Ou,C.N.&Taply,K.J.1981.Photoactivation of Furocoumaryl Carcinogenes/Mutagenes & their Interactions with Nucleic Acid.*In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis". Ed.I.C.Felkner-Marcel Dekker: New York,Basel.
2. Williams,G.1986.Food-Borne Carcinogens. InGenetic Toxicology of the Diet"Ed.Ib.Knudsen. Alan .R.Liss.Inc.: New York.
3. Ames,B.N.1971.The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria.*In* "Chemical Mutagens" Vol.I.Ed.A.Hollaender.Plenum Press: New York,London.

4. Committee on Diet ,Nutrition ,& Cancer.1982.Diet,Nutrition,&Cancer.National Academy press: Washington,USA.

5. Swenson,D.H.&Kadlubar,F.F.1981 .Properties of Chemical Mutagens & Chemical Carcinogens in Relation to their Mechanism of Action. *In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenes." 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- 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.

9- Kalaf,E.A.,Al-Khafaji,ZM. Al-Salmani,M.S. Antimutage- ncity of Arugula (*Eruca Sativa*) & Carrot (*Daucus carota*) Ogaiust indudction of streptomycin resistant mutants in the bacteria.In press.

10- Czyz,A.,Jasieck,J.,Bogdan,A.,Szpilewska,H.&Wegrzyn,G.2000. Genetically medified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators Of mutagenic pollution of marine environments.Appl.Environ.Microbiol.*66*: 599-605.

11- Mateny.S.T.1981.Mutagenic assays in Gram-Negative Bacteria for the Detection of Potential Carcinogens: Activation by Mammalian Microsomal Functions. *In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C .Felkner .Marcel Dekker: New York.Basel.

12- Kier,L.D.,Brusick,D.J.,Auletta,A.E .,Halle,E.S.,Brown,M.M.,Simmon, V.F.,Dunkel,V.,Mecann,J.,Mortelmans,K.,Prival,M.,Rao,T.K.&Ray, V.1986.The *Salmonella typhimurium/* mammalian microsomal assay:A report of the U.S.Environmental protection Agency Gen-Tox Program. Mut.Res.*168*-240.

13- Coleman,D.C.,Pomeroy,H.,Estidge ,J.K.,Keane,C.T.,Cafferky,M., Hone,T.&Foster,T.J.1985.Susceptibility of antimicrobial agents &

analysis of plasmids in gentamicin & methicilin resistant *Staphylococcus aureus* from Dublin hospitals.J.Med.Microbial. *20*:157-167.

14- Eckardt,F.&Haynes.R.H.1981.Quantitatine Measures of Induced Mutagenesis.*In* "Short-Term Tests for Chemical Carcinogens."Eds.H. F. Stich,R .H.C .San.Springer-Venlag: New York,Berlin.

15- Prescott,L.M.,Harley,J.P.&Klein,D.A.1999.Microbiology.4$^{th}$ Edition-McGraw Hill: Boston,New York.

16- Weaver,R.F.&Hedrikc,P.1997.Genetics.3$^{rd}$ Edition.WCB.Wm.C. Brown Publishers.London,Sydeny.

17- Kerszman,G.1975.Induction of mutation to Streptomycin resistance in *Micrococcus radiodurans*.Mut.Res.*28*:9-14.

18- Felkner,I.C.(Ed.).1981.Microbial Tester:Probing Carcinogenesis : Marcel Dekker: New York,Basel.

19- 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 Careinogenesis." Ed.I .C. Felkner .Marcel Dekker:New York,Basel.

20- Vandenbergh,P.A.1993.Lactic acid bacteria, their metabolic products & interference with microbial growth .FEMS Microbial.Rev. *12*:221-238.

21- Al-Khafaji,Z.M.&Al-Rubiee,R.H .1992.Mutagenicity of some organic compounds used or present in foods. Iraqi J.Agric.Sci.*23*:192-203.

22- Davidson,P.M.&Parish,M.E.1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. Food. Technal .(January).148-155.

23- McMahon,R.E.,Cline,J.C.& Thompson,G.Z.1979.Assay of 855 test Chemical in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens.Cancer Res.*39*: 682-693.

24- WHO.1985.International programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria Criteria 51.

# Detection the Mutagenicity of Some Compounds Using Bacterial Mutagenic System

**Zahra M.Al-Khafaji*   Gaith L.Al-Azawi**   Elham A.Khalaf****

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

## Abstract

The mutagenic effect of some Compound was studied in bacterial mutagenic detection system (G-system) composed of three different isolates belong to different genera. $G_3$ (*Bacillus* spp); $G_{12}$ (Arthrobacter spp) and $G_{27}$ (*Brevibacterium* spp). The tested compounds were piractin (active component Cyproheptadine), diacetyl and Tween 80 at 1and100 µg/ml concentrations.

The results revealed that Cyprohepatidine had a mutagenic effect as et induced streptomycin and rifampicin resistant mutants in the isolated as evaluated by measuring the mutant yield and mutant frequency *Mx*.

Diacetyl exhibited similar effect. Tween 80 induced streptomycin and rifampicin in sensitive isolate $G_{12}$ and induced also resistance to streptomycin only in $G_{27}$.