P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2007 ,(1), (3) :45-49

(*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة**

Open Access

تطفير البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام حامض النتروز

خلف جاسم محمد الدليمي

قسم علوم الحياة-كلية العلوم-جامعة الأنبار

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠٠٧/٧/١٩
تاريخ القبول: ٢٠٠٧/١١/٢٥
تاريخ النشر: ١٤ / ٦ / ٢٠١٢

DOI: 10.37652/juaps.2007.15654

الكلمات المفتاحية:

تطفير ،
Pseudomonas aeruginosa ،
حامض النتروز.

الخلاصة:

عزلت البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من مرضى الحروق في مستشفى الرمادي وشخصت اعتماداً على خصائصها الزرعية والمجهرية الكيموحيوية . أجري لها اختيار الحساسية تجاه المضادات الحيوية وأظهرت حساسية للمضادات Trimethoprim Chloramphenicol, Rifampicin Carbenicillin, ., ومقاومة للمضادات , Clindomycin Amoxicillin, Ampicillin Cloxacillin , Tobromycin , Tetracyclin , Cephaloxin , Nalidixic acid, تم دراسة تأثير حامض النتروز المطفر و،أظهرت نتائج عملية التطفير مقاومة البكتريا للتأثير المميت لحامض النتروز وحساسيتها للتأثير المطفر للحامض بالنسبة للمضادات Chloramphenicol , Rifampicin ومقاومتها لعملية التطفير بالنسبة للمضادات Trimethoprim , Carbenicillin.

المقدمة

تعرف الطفرات على انها التغييرات في النمط الوراثي والتي تشمل حدوث تغييرات في تتابعات القواعد النتروجينية للحامض النووي DNA وقد تحدث هذه التغييرات تحت تأثير عوامل خارجية (فيزيائية أو كيميائية) وعندئذ تسمى بالطفرات المستحثة Induced mutation او تحدث بدون أي مسبب خارجي وعندئذ تسمى بالطفرات التلقائية Spontaneous mutation ومن جملة التغييرات التي تحدث في تتابع القواعد هي الأستبدال Base Substitution والأدخال or Addition Insertion والحذف Deletion والأنقلاب Inversion والتضاعف Duplication . تشمل طفرات الاستبدال على طفرات التحول Transition وهو استبدال قاعدة نتروجينية من بيورين (الأدنين والكوانين) محل اخرى من البيورين أو قاعدة من البيريميدين (الثايمين أو اليوراسيل و السايتوسين) محل أخرى من البيريميدين وطفرات التبديل Transversion وهو استبدال قاعدة من البيورين بأخرى من البيريميدين أو بالعكس [١] .

يمكن تقسيم الطفرات المقاومة لمضادات الحياة الى مجموعتين ، المقاومة بخطوة واحدة single step mutation كما في المقاومة للمضاد الحيوي Streptomycin حيث تمتلك البكتريا عدة جينات يكون كل منها مسؤولاً عن مقاومة المضاد بتراكيز مختلفة والمقاومة بعدة خطوات multi step mutation كما في المقاومة للمضاد الحيوي Penicillin من خلال جين واحد حيث تمتلك البكتريا المقاومة بشكل متزايد ومستمر من خلال سلسلة من الطفرات [2] .

هنالك علاقة بين نوع المضاد المستعمل في العلاج وطبيعة المقاومة لهذا يجب أن تؤخذ بنظر الأعتبار . فعندما يكون العقار الاختياري (الواجب استعماله لشفاء المريض) من نوع الذي تقاومه البكتريا بخطوة واحدة فيكون من الضروري اعطاء المريض نوعين مختلفين منه في آن واحد وذلك لتقليل معدل حصول المقاومة تجاه المضادين خلال

* Corresponding author at: Department of Life Sciences - College of Science - University of Anbar, Iraq;

فترة المعالجة . أما إذا كان المضاد الاختياري من النوع الذي تقاومه البكتريا بعدة خطوات فيتوجب على المعالج استعمال تراكيز عالية منه تجنباً من قيام البكتريا بامتلاك المقاومة تجاهه وبالتالي عدم فائدته [3].

المواد وطرق العمل

عزل وتشخيص البكتريا

عزلت البكتريا من أحدى ردهات الحروق في مستشفى الرمادي وشخصت اعتماداً على خصائصها الزرعية على الأوساط الزرعية الأساسية basic media ومنها وسط الاكار المغذي وعلى خصائصها المجهرية وتفاعلاتها الكيموحيوية [4].

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

استخدمت طريقة الأقراص لمعرفة حساسية البكتريا للمضادات تحت الأختبار [4].

التطفير باستخدام حامض النتروز

نميت البكتريا عند درجة حرارة 37c لغاية الطور اللوغاريتيمي ثم رسبت الخلايا بحجم 10مللتر بعملية الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق ثم غسلت الخلايا في ١٠ مللتر من دارئ الفوسفات عند الرقم الهيدروجيني 5.7 , Na2HPO4 1.14g , NaH2PO4 , 14.3g) في لتر من الماء المقطر) . أضيف حامض النتروز بتركيز 0.001 عياري الى المعلق البكتيري وحضن عند درجة حرارة 37م مع التحريك لفترات زمنية مختلفة (60,45,30,15,0 دقيقة) ثم اخذ نموذجان من كل معاملة : 0.1 مللتر خفف بشكل مناسب ونشر على وسط الاكار المغذي لاغراض التعداد البكتيري الحي و 0.2 مللتر أضيف الى 20 مللتر من وسط المرق المغذي وحضن لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة 37م لأغراض التعبير الجيني . خفف نموذج بشكل مناسب ونشر على وسط الاكار المغذي لوحدة وآخر يحتوي على المضادات Carbenicillin , Trimethoprim , Chloramphenicol , Rifampicin عند التركيز المثبط الأدنى ثم حضنت عند درجة حرارة 37 م لمدة ٢٤ ساعة لعزل وحساب تردد الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية [5] .

النتائج

عزل وتشخيص البكتريا

أسفرت عملية زرع البكتريا على الأوساط الزرعية الأساسية basic media عن ظهور مستعمرات خشنة ذات رائحة عفنة مع انتاجها صبغة خضراء مزرقة (صورة ١) . واظهرت الفحوصات المجهرية عن كونها بكترية عصوية سالبة لصبغة كرام متحركة وغير مكونة للسبورات أما تفاعلاتها الكيموحيوية فبينها جدول ١ .

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

اظهرت البكتريا مقاومة للمضادات Amoxicillin, Ampicillin Tobromycin, Tetracyclin, Cephaloxin , Nalidixic acid, Cloxacillin, Clindomycin وحساسية للمضادات Trimethoprim , Carbenicillin, Chloramphenicol , Rifampicin .

التطفير باستخدام حامض النتروز

منحنى بقاء بكتريا Pseudomonas aeruginosa بعد تعريضها لحامض النتروز (0.001 عياري) لفترات زمنية مختلفة يبينها شكل ١ . اظهرت البكتريا مقاومة للتأثير المميت للحامض حيث أن معدل فقدان حيوية البكتريا كان بطيئاً ولم يحصل انحدار حاد في حيويتها حتى بعد ٦٠ دقيقة هذه النتائج تؤكد على أنه رغم مقاومة البكتريا Pseudomonas aeruginosa للتأثير المميت للحامض فأنها حساسة لتأثيره المطفر وأن الطريقة الملائمة لاحداث الطفرات في هذه البكتريا

بالنسبة للمضادات Chloramphenicol , Rifampicin وغير ملائمة للحصول على طفرات مقاومة للمضادات Trimethoprim , Carbenicillin .

المناقشة

عزل وتشخيص البكتريا : يعزى لون الوسط الى انتاج البكتريا الى الصبغة الزنجارية الخضراء المزرقة في الوسط الزرعي والتي هي عبارة عن صبغتي pyocyanin , fluorescin . أما حركة البكتريا الذي بينه الفحص المجهري فيعزى إلى امتلاك البكتريا سوط قطبي تلجأ البكتريا الى التفاعلات الكيميوحيوية لأجراء تغييرات على المغذيات من أجل تحرير الطاقة اللازمة لأغراض النمو والتكاثر [٤].

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

يعزى إمتلاك الكائن المجهري لصفة المقاومة تجاه احد مضادات الحياة وامتلاكه المقاومة أيضاً لمضادات حيوية أخرى لم يسبق أن تعرض لها الكائن المجهري من قبل الى عدة أسباب منها التشابه الكيمياوي للمضادات الحيوية والمسارات الأيضية المتبادلة والتغيرات غير النوعية مثل التغير الحاصل في نفاذية غشاء الخلية كما في المقاومة للتتراسايكلين وتسمى هذه الظاهرة بالممقاومة المشتركة cross resistance . تعزى حساسية البكتريا للمضاد الحيوي Rifampicin بسبب تأثيره على الحامض النووي DNA في حين يتداخل المضاد Chloramphenicol مع عملية البناء البروتيني لخلية البكتريا . يعتبر المضاد الحيوي Carbenicillin من المركبات ذات التأثير الواسع broad – spectrum وفاعليته تكمن في قابليته على اختراق جدار خلية البكتريا والارتباط بالبروتينات المكونة لجدار الخلية ، في حين تعزى حساسية البكتريا للمضاد الحيوي Trimethoprim الى ايقافه مفعول بعض الأفعال الحيوية الأساسية في العملية الأيضية حيث يقوم بتعطيل عملية تخليق حامض الفوليك في خلية البكتريا ذات الأهمية البالغة في عملية تكوين الأحماض النووية والبروتينات اللازمة لبناء خلايا بكتيرية جديدة [٤] .

التطفير باستخدام حامض النتروز

اظهرت النتائج مقاومة بكتريا Pseudomonas aeruginosa للتأثير المميت لحامض النتروز وحساسية البكتريا للتأثير المطفر للحامض بالنسبة للمضادات Rifampicin و Chloramphenicol و عدم حساسيتها للتطفير بالنسبة للمضادات Carbenicillin و Trimethoprim وهي تماثل النتائج التي توصل اليها Bowring وجماعته [٦] و kerszman [٧] . يعمل حامض النتروز على ازالة مجموعة الأمين واحلال الأوكسجين محلها لثلاث قواعد هي الكوانين والأدنين والسايتوسين محولاً إياها الى الكزانثين والهايبوكزانثن والبوراسيل على التوالي . للكزانثين قابلية مشابهه للكوانين من حيث طبيعة الأزدواج مع القواعد لذا لا يتوقع استحداث طفرات في هذه الحالة أما بالنسبة للهايبوكزانيثن فيمتلك قابلية إزدواج مع السايتوسين مؤدياً الى تحول الزوج أدنين : ثايمين الى الزوج كوانين : سايتوسين محدثاً بذلك طفرة تحول والتي يحدثها اليوارسيل أيضاً بارتباطه مع الأدنين محولاً الزوج كوانين : سايتوسين الى الزوج أدنين : ثايمين [٨] .

REFERENCES

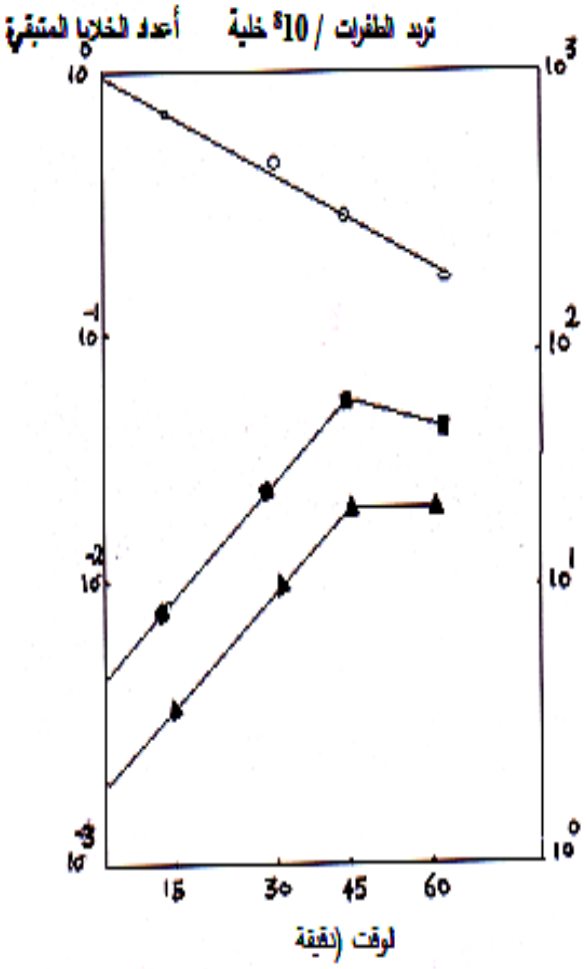
[1]Auerbach , c. (1962) . Mutation ,an introdution to research on mutagenesis . Oliver and Boyed , Edinburgh .

[2]Shortle , D . D . , Maio , D . and Nathans , D. (1981) . Directed Mutagenesis . Ann.Rev.Biochem . 15:265-294.

[3]Singer , B.and Kusmierek , J . T . (1982). chemical mutagenesis . Ann.Rev.Biochem. 51: 655 – 693 .

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2007 ,(1), (3) :45-49

البكتريا	Indole production	Methyl Red	Voges pros Kauer (VP)	Citrate utitization	Catalase	Oxidase
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	+	+	+



شكل ١ : التأثير المميت والمطفر لحامض النتروز

التأثير المميت للحامض

التأثير المطفر للحامض تجاه المضاد **Rifampicin**

تأثير المطفر للحامض تجاه المضاد **Chloramphenicol**

[٤] Al- Habib , H.M. and Al-Talib , A.B. (1985). pseudomonas aeruginosa isolated from four types of infections and its sensitivity to antibiotics . journal of faculty of Medicin (Baghdad) 27: 35-43

[٥]Al-Bakri,G.H.and Umran , M.A. (1994) Mutagenesis of a novel halotolerant bacteria (Micrococcus SP.) using ultraviolet light and N-Methlyl –N-nitro-N-Nitroso- guanidine Iraqi Journal of Microbiology , vol. 6(2): 55-64 .

[6]Bowring , S.N. and Morris , J . C . (1985) – Mutagenesis of Clostridium acetobutylicum . J . APPI . Bacteriol . 58:577-584.

[7]Kerszman , G . (1975) . Induction of mutation to Streptomycin resistance in Micrococcus radiodurans . Mutation Res . 28: 9-14 .

[8]Frifelder , D . (1987) . Molecular biology – 2nd . Yones and Barttett Boston .

صورة ١ : بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على الأكار المغذي

جدول ١ : التفاعلات الكيموحيوية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2007 ,(1), (3) :45-49

MUTAGENESIS OF A *Pseudomonos aeruginosa* By USING NITROUS ACID

Khalaf Jasim Mohammed Al-Dolaimi

Dept. of Biology- College of Science-AL-Anbar University
E.mail:scicoll@yahoo.com

ABSTRACT

The bacterium Pseudomonas aeruginosa was isolated from patients of burns in Al-Ramadi hospital and diagnosed according to its cultural , microscopic and biochemical properties. sensitivity test of the bacterium against antibiotics was established and the results appeared it was sensitive to the antibiotics Carbenicillin , Chloramphenicol , Rifampicin and Trimethoprim and resistant to the antibitcs Amoxicillin , Ampicillin Clindomycin Cloxacillin , Nalidixic acid , Cephaloxin , Tetracyclin and Tobromycin . Results of mutagenesis showed resistance of the bacterium to the lethal effect of nitrous acid and its sensitivity to the mutagenic effect of the acid relative to the antibiotics Rifampicin and Chloramphenicol but not to the antibiotics Carbenicillin and Trimethoprim .