اختبار القابلية التطفيرية لمبيد الديكلوفوب مثيل باستعمال نظام بكتيري للكشف عن المطفرات

نادرة سلمان محمد

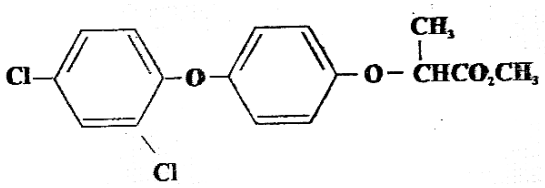
معهد الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية، جامعة بغداد.

الخلاصة

استعمل نظام غيث المكون من ثلاث عزلات تعود لثلاث أجناس بكتيرية مختلفة لاختبار القابلية التطفيرية أو السمية لمبيد الديكلوفوب مثيل المستعمل كمبيد زراعي على الأدغال على نطاق واسع . اوضحت النتائج تماثل تأثير المبيد على العزلات الثلاث عموما. أذ سبب زيادة في تضاعف الدنا في تراكيز منخفضة تراوحت بين (1-10مايكروغرام /مليليتر) كما سبب المبيد انخفاضا كبيرا في عيوشية العزلات بعد المعاملة بتراكيز أعلى تراوحت (25-200 مايكرو غرام/مليليتر)، ان تردد الطفرا ت منخفضا جدا عند استعمال تراكيز عالية من المبيد تراوحت م ا بين(100-200 مايكروغرام/مليليتر)، وحث المبيد طفرات الستريبتومايسين فقط في العزلتين G12وG27 ولم تستحث أي طفرة للريفامبيسين من ذلك يتضح أن للمبيد تأثيرا ساما قاتلا وليس مطفرا.

المقدمة

تعرف المبيدات على انها مواد كيماوية تعمل على تحطيم أو أعاقة أو التقليل نمو الآفات الزراعية سواء كانت حشرات أم نباتات ضارة أو الآفات التي تسبب ضررا بالصحة العامة [1]، ويتكون المبيد من جزئين الأول هو الجزء الفعال (Active Part) المسؤول عن قتل أو تحطيم الآفة أما الجزء الثاني فهو الجزء الخامل (Inert Part) المسؤول عن جعل المبيد أكثر فعالية أو أسهل استعمالا وهو أما مادة كيميائية أو مادة حيوية ويجب إن لا تكون سامة [2] إن مبيد الديكلوفوب مثيل من مبيدات الأعشاب ويستخدم بصورة خاصة للتخلص من الأدغال الرفيعة الأوراق في حقول الحنطة وهو من مجموعة (Propionate) ووزنه الجزيئي (341.2) غم / مول والصيغة الجزيئية له ($C_{16}H_{14}CL_2O_4$) [1] كما موضح في الشكل(1).



شكل(1) التركيب الكيمياوي لمبيد الديكلوفوب مثيل.

إن السلبيات التي بدأت بالظهور في العقود الأخيرة من جراء استخدام المبيدات في مجال الزراعة والصحة فقد وجد ان المبيدات تسبب ثلاثة ملايين حالة تسمم سنويا وحوالي (200 000) حالة وفاة [3]، لذلك ترتب عليها إيجاد المزيد من الاختبارات السمية والبيئية والحيا تية لتحديد درجة خطورتها ومن هذه الاختبارات اختبار الأنظمة الحيوية لتقدير القابلية التطفيرية للمواد الكيماوية ، وتشكل الأنظمة الميكروبية ابسط الأنظمة المستعملة في الكشف عن المطفرات[4] إذ تستعمل في تقدير مدى خطورة المسرطنات من النواحي الكمية[5] اعتمادا على حقيقة إن عملية التطفير هي إحدى مؤشرات التسرطن[6] ومن أكثر الأنظمة العالمية شيوعا نظام أيمس Ames System، الذي يعتمد على حث الطفرات الراجعة في بكتيريا السالمونيلا *Salmonella typhimurium TA*100 *في فحص* المركبات السامة والمسرطنة [7] ومن هذه الأنظمة ايضا ، نظـــــــــــام G System المكون من ثلاث عزلات: ***Bacillus* G3,:[*Brevibacterium*G12, *Arthobacter*G27** ويعتمد على حث طفرات مباشرة لمقاوم ة الستربتومايسين والريفامبيسين باعتبارهما صفات كروموسومية في معظم البكتيريا[8] ان العراق من البلدان الزراعية التي تستخدم المبيدات بشكل واسع اذ بلغ مجموع ما أستخدم في اثناء العشرة سنين الاخيرة حوالي اكثر من (750) الف طن [9] وتهدف الدراسة الى تحديد فيما اذا كان مبيد الديكلوفوب مثيل ساما اومطفرا باستعمال نظام G البكتيري.

المواد وطرق العمل

ألأوساط الغذائية

- وسط أساس اكار الدم Blood Agar base من شرك ة Mast/ England.
- وسط الأكار المغذي Nutrient Agar من شركة Merck/ Germany.

العزلات

من د .زهرة الخفاجي/ معهد الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية/جامعة بغداد.

المضادات الحيوية

- مضاد الستربتومايسين Streptomycin من شركة Ajanta/ India.
- مضاد الريفامبسين Refampicin من معمل الأدوية سامراء/ العراق.

المبيد

ديكلوفوب مثيل(السوق المحلية).

المحاليل

- محلول التخفيف،0.1% من التربتون في الماء ألمقطر.
- محلول دارئ الفوسفات : حضر بتركيز 0.05 عياري وأس هيدروجيني5.5 وذلك بإذابة 0.87 غرام من فوسفات البوتاسيوم أحادي الهيد روجين في 100 مللتر من الماء المقطر.
- محاليل المضادات الحيوية :حضرت ألمحاليل ألخزينة باذابة 1 غرام من الستربتومايسين في 10 مللتر ماء مقطر المعقم ليصبح التركيز 100.000 مايكروغرام / مللتر وحضر الريفامبيسين بإذابة 300 ملي غرام في 10 مللتر من الماء المقطر المعقم ليصبح التركيز 30000 مايكروغرام/ مللتر وتحفظ المحاليل في الثلاجة لحين الاستعمال (مدة أسبوع).

اختبارات التطفير

اجريت اختبارات التطفير وفق الطريقة الموصوفة في المصدر [8] تم تعقيم المبيد الكيماوي Diclophobemethyle باستخدام مرشح دقيق 0.22 مايكروميتر وحفظ في قزينة زجاجية محكمة الغلق .نميت البكتريا العزلة G27 وG12 وG3 في الوسط المغذي السائل لمدة 18 ساعة في درجة حرارة 35م˚ حصدت الخلايا عند كثافة ضوئية 0.15–0.25 على طول موجي 600 نانوميتر بنبذها مركزيا وغسلت في دارئ الفوسفات ذو الاس الهيدروجيني 5.5 ثم علقت بالحجم رفسه من دارئ الفوسفات وقسمت الى عدة اقسام بحجم 5 مللتر وحسب العدد الحي في السيطرة عند المعاملة صفر باستعمال التخافيف والنشر بالعروة الثلاثية على وسط اساس الدم الصلب. عوملت النماذج بالمبيد بتركيز (50،25،10،5،1، 75،100،150،200) مايكروغرام/ مللتر لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 37م˚، بعد ذلك فصلت الخلايا بالنبذ المركزي وغسلت بدارئ الفوسفات ثم علقت به وحدد العدد الحي للخلايا بعد المعاملة مباشرة، ونشرت البكتيريا بواقع 200 مايكروليتر من العالق البكتيري لكل طبق بعد كل معاملة على اطباق حاوية على المضادات الحياتية وهي الستربتومايسين بتركيز 10 مايكروغرام / مللتر والريفامبسين بتركيز 20 مايكروغرام/مللتر والاثنين معا لايجاد الطفرات المقاومة وحضنت النماذج بدرجة حرارة 37م˚ لليوم التالي لغرض التعبير الظاهري، وتم تحديد عدد الخلايا الحي والطفرات المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة.

الحسابات

أجريت الحسابات وفق المراجع الخاصة[10].

1.تحديد الجزء الحي المتبقي Survival fraction (Sx).

Sx = Ns/No

x تركيز المطفر.

Ns عدد الخلايا المتبقية بعد المعاملة مباشرة.

No عدد الخلايا الحية في نموذج السيطرة بدون معاملة.

2.تردد الطفرات Mutant frequency (Mx).

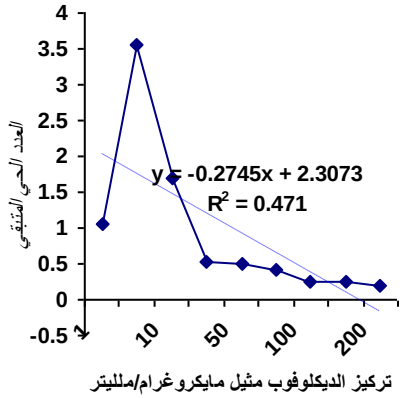
$Mx=N_mx/N_8$

N_mxعدد الطفرات المستحثة عند تركيز معين.

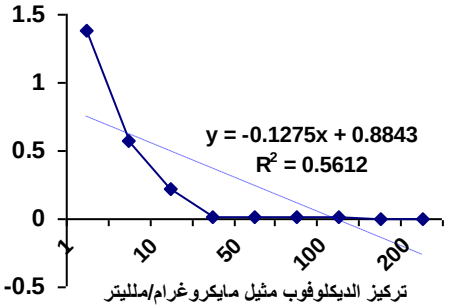
N_8 عدد الخلايا الحية المتبقية بعد المعاملة مباشرة عند تركيز معين.

النتائج والمناقشة

يعتبر مبيد الديكلوفوب مثيل من المبيدات العشبية واسعة الاستعمال[11] وقد تم استعمال عزلات النظام G لاختبار تاثيره السام والمطفر. اذ تبين انه يسبب زيادة في معدل انقسام الخلايا للعزلتين G3,G27 عند معاملتها بتراكيزمنخفضة تراوحت ما بين (1–10) مايكروغرام/مل من المبيد، مما ادى الى ارتفاع في عدد الخلايا بعد المعاملة، وكما هو موضح في الشكلين (2،4) وهذا يشابه ماتوصل اليه من ان المبيد يسبب زيادة تصنيع الـ DNA وزيادة انقسام الخلايا بصورة غير طبيعية وغير مسيطر عليها. وان ذلك يحدث نتيجة تأثير المبيد على مستقبلات خاصة في الغشاء الخلوي تعرف Activited Peroxisome Proliferator Receptor(PPAR) وتنشيطها وال تي تعمل بدورها كعوامل استنساخ (Transcription Factors) وتزيد من تعبير بعض الجينات المسؤولة عن تكاثر الخلايا .وتعرف طريقة تكاثر الخلايا بواسطة هذه المستقبلات (Peroxisome Proliferation) [12]. بينما لم يؤد تعرض العزلة G12 بتراكيز واطئة من المبيد إلى زيادة غير طبيعية في معدل الانقسام، كما موضح في الشكل (3). بينما ادى تعرض العزلات الى تراكيز اعلى من البيد الى موت الخلايا المعاملة وانخفاض واضح في عيوشية الخلايا ويعود ذلك الى التشوهات في الدنا التي يحدثها المبيد مما يسبب حدوث طفرات مميتة تسبب انخفاضا وا ضحا في عيوشية العزلات. ويظهر ان ان العزلة G3 اقل تأثرا من العزلتين الاخريتين وربما يعود ذلك الى كونها عزلة مكونة للابواغ خلافا لهما[13] وتظهر قيم معامل الارتباط للعزلات (G27=0.53, G12=0.74, G12=0.69) وجود ارتباط معنوي بين العزلتين (G12,G3) على نسبة فروق مءنوية 5% وضعف معامل الارتباط للعزلة G27 معهما .ووجود علاقة عكسية بين زيادة تركيز المبيد وبين عيوشية الخلايا اجمالا للعزلات الثلاث. اذ كلما زاد التركيز انخفضت عيوشية الخلايا وبعدة دورات لوغاريتمية عند تراكيز تراوحت ما بين (50–200) مايكروغرام/مل .ان تعرض عزلات النظام الى هذا المبيد ادى الى حث طفرات الستربتومايسين فقط وبتردد منخفض جدا عند تراكيز عالية تراوحت مابين (75–200) مايكروغرام لايكافئ نسبة القتل العالية في العزلتين G12,G27 وكما موضح في الشكل (5) والشكل(6) على التوالي ،وهذا يتفق مع كون العزلةG12اكثر حساسية للتطفير[14،8] ولم تستحث اي طفرة للريفامبسين وربما يعود ذلك الى ان المبيد لايؤثر على المنطقة الوراثية الخاصة بمقاومة الريفامبسين [15] ومن خلال النتائج يتضح ان للمبيد تأثيرا سميا قاتلا وليس تطفيرا مسرطنا.



شكل (2) تأثير التراكيز المتدرجة من الديكلوفوب مثيل على العدد الحي المتبقي للعزلة G3.



شكل (3) تأثير تراكيز متدرجة من الديكلوفوب مثيل على الجزء الحي المتبقي للعزلة G12.

References

[1] الجبوري، ابراهيم جدوع، عواد، هاشم ابراهيم، كسل، صلاح مجيد. "المبيدات المسجلة والمستخدمة في الزراعة والصحة العامة في العراق اللجنة الوطنية لتسجيل واعتماد المبيدات". وزارة الزراعة، 2002.

[2] Cox, C. "Do pesticides contaminate our rivers, streams, and wells". J. Pesti. Reform., 1999,.pp.6-8.

[3] Kier, L.D; Brusick, D, J; Auetta, A.E; Halle, E.S; Brown, M.M ; Simmon,V.F; Dunkel, V; McCan ,J; Mortelman, S.K; Prival, M; Rao, T.K & Ray,V. "The Salmonella typhimrium/ mammalian microsomal assay: A report of the U.s.environmental Protection Agency Gene-Tox Program". Mut.Ref, 1986, pp.69-240.

[4] Eddleston, L.; Karalliede, N.; Buckley, R. and Fernando, G. "Pesticide poisoning in developing world, a minimum pesticides list."Lancet., 2002, pp.1163-1167.

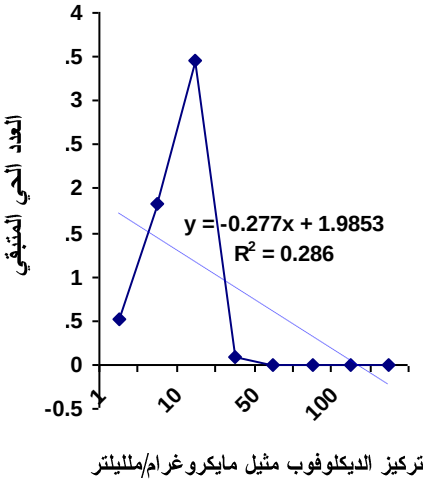
[5] Swenson, D.H; Kadlubar, F.F. "Properties of Chemical Carcinogens in Relation to their mechanisms of Action .In Microbial Tester: probing Carcinogenesis" Ed.I. Felkner. Marcel Dekker : New York , Basel, 1980.

[6] Gericke, D. "Microbiological short-time test for the evaluation of mutagenic potential of chemical substances Naturwissenschaften", 1983, pp.173-179.

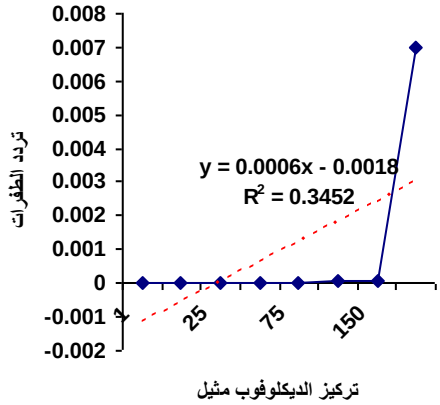
[7] Amse, B. and Druston, W. " An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens: assay of 300 chemicals". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1973, pp. 782-786

[8] Mohammed, A.S. Mutagenic Activity of N-butyl and N-Hexyl Azide in the Salmonella Muatgenicity Test (Ames Test) Journal of Applied Sciences Research, Vol.3, No.9, 2007, pp.886-889.

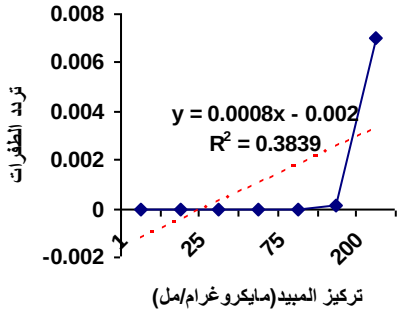
[9] الخفاجي،زهرة محمود: والعزاوي، غيث لطفي عارف . "تطوير نظام بكتيري لتحديد المطفرات في البيئة والأغذية (استعمال المطفرات المحورة هيدروكسيل امين) "مجلة أم سلمة للعلوم، المجلد 3، العدد2 ، 2006، ص ص 221–228.



شكل (4) تأثير الديكلوفوب مثيل على العدد الحي المتبقي لخلايا العزلة G27.



شكل (5) تأثير الديكلوفوب مثيل على تردد الطفرات للعزلة G12.



شكل (6) تأثير الديكلوفوب مثيل على تردد الطفرات للعزلة G27.

[10] الجميلي، صبحي منصور ، ابراهيم شعبان، السعداوي، قيس كاظم، زوين، صالح حسن، سمير . "الكتاب السنوي للمبيدات. اللجنة الوطنية لتسجيل واعتماد المبيدات ". وزارة الزراعة. المجلد 3. العدد 1، 2005.

[11] السلماني، مصطفى سامي."استخدام عروة مصنعة محليا لتحديد العدد الحي للبكتيريا في نماذج مختلفة " رسالة دبلوم عالي، معهد الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية، جامعة بغداد، 2004.

[12] Miller, J, H. "Experiments in Molecular Genetics. cold Spring Harbor Laboratory": New York., 1972 .

[13] حبيب،شوكت عبد الله. "مقاومة ثلاثة أدغال رفيعة الأوراق لمبيدي ديكلوفوب ميثال وك لودينافوب– بروبرجيل في حقول الحنطة في العراق " مجلة الزراعة العراقية، م13، ع2، 2008، ص185–194.

[14] Fricke, R. "Evaluation of the carcinogenic potential of diclofop-methyl Cancer assessment Document. Environ. Health Prespect", 2000, pp. 19-32.

[15] Prescott, J.M; Harley,J.P .and Klein,D.A "Microbiology" 4th Edition. McGraw Hill. Boston, London, 1999.