تطفير بكتريا Gardnerella vaginalis المعزولة محليا باستخدام النتروسوجوانيدين والأشعة فوق البنفسجية

ربا عزت السعدي[1]، د. ماجد حسين الجيلاوي[2]، د. زهير نعمان العاني[1]

[1] كلية التقنيات الطبية، هيئة المعاهد الفنية

[2] كلية العلوم، جامعة النهرين

الخلاصة

درست الظروف المثلى لتطفير بكتريا Gardnerella vaginalis K3 المعزولة محليا باستخدام نوعين من المطفرات المباشرة [نتروسوجوانيدين N-methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG)] والأخرى من المطفرات غير المباشرة [الأشعة فوق البنفسجية (U.V)] وتبين أن كلا المطفرين كان مؤثرين في تحفيز الطفرات الوراثية في هذه البكتريا، وأن الظروف المثلى لتطفير البكتريا بمادة MNNG هو معاملة البكتريا المعلقة بدارئ الفوسفات (Ph 5.7) بتركيز 30 مايكروغرام/مليلتر في الظلام ولمدة 60 دقيقة. أما الظروف المثلى لتطفيرها بالأشعة فوق البنفسجية فكانت بتعريض البكتريا النامية في وسط النمو السائل و[illegible] بجرعة 25جول/م^2 من الأشعة بطول موجي 254 نانوميتر .

المقدمة

تعد بكتريا (G. vaginalis) من أهم البكتريا المسببة لالتهاب المهبل البكتيري Bacterial vaginosis(B.V) وهو من أكثر أمراض القناة المهبلية شيوعا (1-2-3) ويشبه أنواع أخرى من البكتريا اللاهوائية مثل Bacteroid spp. ، Prevotella spp. و Mobiluncus [4] . وبكتريا G.vaginalis بكتريا متغايرة الاستجابة لصبغة كرام ، عصوية متعددة الأشكال وذات جدار خلوي رقيق ومميز [5] ، لها القدرة على الالتصاق بالخلايا الظهارية البشرية وقابليتها على إنتاج الهيموليسين الذي يعد أحد عوامل ضراوة البكتريا المرضية [6] كما تفرز السياليديز [7] وتصاحب الإصابة بهذه البكتريا

رائحة غير مستحبة و إفرازات مهبلية متباينة الكمية ذات قوام هتروجينية [5 ، 7]

و ظهور الخلايا المفتاحية (clue cell) (وهي خلايا طلائية تكون محاطة بأعداد كبيرة من البكتريا المهبلية غير الطبيعية) في كل من التحضيرات الرطبة وعند التصبيغ بصبغة كرام كما يلاحظ غياب [illegible] عدد قليل جدا من بكتريا Lactobacillus حيث يؤدي نمو بكتريا G. vaginalis في منطقة المهبل إلى ارتفاع الرقم الهيدروجيني إلى أكثر من 4.5 وهذا يؤدي بالتالي إلى تثبيط نمو بكتريا Lactobacillus ،

فضلا عن ندرة وجود كريات الدم البيضاء متعددة الأنوية polymorphonuclear leucocytes في كل من التحضيرات الرطبة والمصبوغة(8،9).

إن تأثير العوامل المطفرة على البكتريا عموما يكون إما مباشرا أو غير مباشر. فالعوامل المباشرة تسبب ازدواجا خاطئا للقواعد النتروجينية [تسجع على الاستبدال الخاطئ للقواعد] ومن هذه المواد MNNG،EMS (10) .

أما العوامل غير المباشرة فيكون تأثيرها التطفيري كنتيجة لعملية التصليح الخاطئ للضرر الذي يتم بواسطة نظام SOS(النظام المحفز للاستجابة الطارئة والذي يحفز عند الضرر [11]) مثل الأشعة فوق البنفسجية (11) والمايتومايسين C (12) .

تختلف البكتريا في استجابتها لنوع من المطفرة فمنها ما يمكن أن تطفر بشكل جيد بالعوامل المباشرة والأخرى تتأثر فقط بالعوامل غير المباشرة ومنها ما تكون مستجيبة لكلا النوعين وهناك بكتريا تتطفر بشكل جيد بكلا النوعين من المواد المطفرة مثل بكتريا E.coli وتختلف الاستجابة حتى ضمن أفراد النوع الواحد (13،14) لذا فإن عملية التطفير ليست شمولية وإنما هي حالة خاصة لكل نوع بكتيري ولغرض إنجاز عملية التطفير بشكل مناسب لأي نوع بكتيري يتطلب التعرف على المطفر المناسب وتهيئة الظروف المثلى للحصول على الطفرات الوراثية .

إن أول متطلبات دراسة وراثة البكتريا هي توفر طفرات وراثية مختلفة يمكن استغلالها لإجراء مثل هذه الدراسات وللحصول على مثل هذه الطفرات يجب إيجاد الوسائل المثلى من حيث استخدام المطفرات المختلفة لذا كان هدف الدراسة الحالية هو تحديد الظروف المثلى لتطفير بكتريا G.vaginalis بالمطفرات الشائعة الاستعمال لاستخدامها لاحقا في عزل طفرات وراثية مختلفة من هذه البكتريا والتي تستخدم في تطوير الدراسات الوراثية لهذه البكتريا

المواد وطرائق العمل

- البكتريا:

استخدمت في هذه الدراسة بكتريا G. vaginalis المعزولة R3 التي عزلت من قبل AL-Saady (15).

- الأوساط الزرعية

1-الوسط الانتقائي: وسط كولومبيا اكار (Columbia agar) المضاف له دم بشري (صنف O) بنسبة 5% ومضاد حيوي (حامض الناليدكسيك) بتركيز 15 مايكروغرام/مليلتر استخدم لتنمية وحفظ البكتريا.

2-وسط نقيع الدماغ والقلب (Oxoid) المضاف له مصل دم (5%) استخدم لتنمية وحفظ البكتريا.

3- Tryptic Soya agar (Oxoid) استخدم لتنمية البكتريا .

- إنماء البكتريا

نميت عزلة البكتريا G.vaginalis (R3) وذلك بتلقيح 50 مليلتر من وسط نقيع الدماغ والقلب ب(0.1) مليلتر من مزرعة فتية لنفس البكتريا وحضنت المزرعه بدرجةحرارة37مئوية مع الرج مدة 18 ساعة.

- معاملة عزلة البكتريا G.vaginalis R3 بمادة النتروسوجوانيدين

حصدت خلايا بكتريا G. vaginalis (R3) من 50 مليلتر من مزرعة نامية إلى منتصف الطور اللوغاريتمي في وسط نقيع الدماغ و القلب السائل المضاف له مصل دم (5%) بواسطة الطرد المركزي و بسرعة 6000 دورة /دقيقة و بدرجة حرارة 4 مئوية مدة 10 دقائق . غسلت الخلايا مرتين بدارئ الفوسفات (pH 5.7) (NaH_2PO_4 14.3 غم ، Na_2HPO_4 1.14 غم ماء مقطر/ لتر) ثم علقت ب 50 مليلتر من الدارئ نفسه ووزعت على خمسه دوارق (سعة 100 مليلتر) و بواقع 10 مليلتر في كل دورق .أضيف المطفر (نتروسوجوانيدين) المذاب في نفس الدارئ إلى الدوارق للحصول على تراكيز مختلفة كالآتي (0، 20 ، 30 ، 40 ، 50) مايكروغرام /مليلتر . حضنت الدوارق في حمام مائي بدرجة حرارة 37 مئوية مع الرج الهادئ مدة 60 دقيقة .بعد انتهاء الحضن اخذ نموذجان من كل دورق (0.1 مليلتر) خفف الأول بصورة مناسبة بواسطة نقيع الدماغ و القلب السائل و نشر على وسط Tryptic Soya agar المضاف له سيرم و حضنت الأطباق بوجود غاز ثاني أوكسيد الكربون (10%) بدرجة حرارة 37 مئوية مدة 48 ساعة لحساب العدد الكلي الحي و رسم منحني البقاء لهذه البكتريا .أما النموذج الثاني (0.2 مليلتر)فاستخدم لتلقيح دورق حاو على 10 مليلتر من وسط نقيع الدماغ و القلب السائل المضاف له مصل دم (5%) و حضن بوجود ثاني أوكسيد الكربون (10%) بدرجة حرارة 37 مئوية مدة 48 ساعة لغرض التعبير الجيني . بعد انتهاء فترة الحضن أخذت نماذج من المزارع المطفرة و نشرت بعد إجراء التخافيف المناسبة على وسط Tryptic Soya agar المضاف له مصل دم و الحاوي على ريفامبسين بتركيز 4 مايكروغرام /مليلتر (علما ان التركيز المثبط الأدنى من الريفامبسين و الذي استخدم كدليل وراثي كان 1.5 مايكروغرام /مليلتر) و ذلك لعزل الطفرات المقاومة لهذا العقار .كما نشرت نماذج أخرى على وسط Tryptic Soya agar المضاف له مصل دم لحساب العدد الحي الكلي . حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 37 مئوية بوجود غاز ثاني أوكسيد الكربون (10%) مدة 48 ساعة و تم حساب تكرار الطفرات من حاصل قسمة عدد الخلايا الطافرة في 1 مل من النموذج المطفر على عدد الخلايا الكلي الحي لذلك النموذج .

تكرار الطفرات =عدد الخلايا الطافرة في 1 مليلتر من النموذج المطفر / عدد الخلايا الكلي الحي لذلك النموذج المطفر

- تشعيع عزلة البكتريا G.vaginalis (R3) بالاشعة فوق البنفسجية

حصدت خلايا بكتريا G.vaginalis (R3) من 10 مليلتر في مزرعة منماة بالظروف السابقة نفسها و بعد أن غسلت الخلايا مرتين بواسطة وسط نقيع الدماغ و القلب السائل علقت ب 10 مليلتر من الوسط نفسه ثم اخذ 3 مليلتر من عالق الخلايا و وضع في طبق معقم و عرض للتشعيع في جهاز (Sigma) U.V.Transilluminator و بطاقة (10، 20، 30، 40) جول /م2 .اخذ نموذجان من كل معاملة و اتبعت الخطوات السابقة نفسها (في حالة المعاملة بالنتروسوجوانيدين) لتحديد التأثير القاتل و المطفر للأشعة فوق البنفسجية .

النتائج والمناقشة

- تطفير البكتريا بمادة النتروسوجوانيدين

يوضح الشكل – 1 – التأثير القاتل و المطفر للتراكيز المختلفة من مادة نتروسوجوانيدين على البكتريا G.vaginalis (R3) المعلقة بدارئ الفوسفات PH 5.7 . أظهرت النتائج (الشكل 1) أن البكتريا كانت حساسة للقتل بواسطة هذا المطفر إذ نلاحظ زيادة نسبة القتل طرديا مع زيادة تركيز المطفر و إن أقصى نسبة قتل (68%) كانت عند استخدام 50 مايكروغرام /مليلتر من المطفر .

أما بالنسبة لتردد الطفرات الوراثية فقد لوحظ زيادة معدل تردد الطفرات المقاومة للريفامبسين مع زيادة تركيز النتروسوجوانيدين لغاية التركيز 30 مايكروغرام /مليلتر إذ بلغت $1.69X10^{-3}$، ينخفض بعده تردد الطفرات في التراكيز

الأعلى (40 ، 50 مايكروغرام /مليلتر) . و يتضح مما سبق أن حساسية بكتريا G.vaginalis (R3) لهذا المطفر ليست عالية و قد يعزى ذلك إلى أن عملية التطفير أجريت في وسط دارئ الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 5.7 ، و هذا الرقم الهيدروجيني يوفر نوعاً من الثبات لمادة النتروسوجوانيدين إذ وجد أن المطفر يكون ثابتاً في الأرقام الهيدروجينية الحامضية حوالي (pH5) في حين يكون أقل ثباتاً في الأرقام الهيدروجينية الأعلى ، إذ يتحلل إلى Diazomethane و قد يؤدي إلى تغييرات عديدة في البكتريا و ذلك بتأثيره على الدنا و بقية المواد في الخلية (16) ، فضلاً عن أن الكائنات الحية تختلف في استجابتها للمطفرات أو المواد الكيميائية و الفيزيائية المختلفة تبعاً لطبيعتها الوراثية و الفسلجية ، و أن عملية التطفير هي حالة خاصة بكل نوع بكتيري (13، 14، 17) . و نتائج الدراسة الحالية توصي بأن أفضل ظروف مثلى لتطفير هذه البكتريا بمادة النتروسوجوانيدين يتم من خلال معاملة البكتريا المعلقة بدارئ الفوسفات (pH 5.7) بتركيز 30 مايكروغرام/مليلتر من المطفر و لمدة ساعة .

- **تطفير البكتريا بالأشعة فوق البنفسجية**

يوضح الشكل (2) أن بكتريا G. vaginalis (R3) النامية في وسط نقيع الدماغ و القلب أظهرت حساسية عالية جداً للتأثير القاتل للأشعة فوق البنفسجية ، و يلاحظ زيادة نسبة القتل طردياً مع زيادة تعرض البكتريا للإشعاع ، و بلغت أعلى نسبة قتل 99.84 % عند تعرض البكتريا لجرعة من الإشعاع مقدارها 40 جول/م^2 . أما بالنسبة لتردد الطافرات فيلاحظ أن تردد الطفرات يزداد طردياً مع استمرار تعرض البكتريا للأشعة فوق البنفسجية إلى حد 30 جول/م^2 بعدها يحدث انخفاض في تردد الطفرات ، يتضح أن بكتريا G.vaginalis حساسة جداً للتأثير القاتل للأشعة فوق البنفسجية إذ لوحظ زيادة نسبة القتل طردياً مع زيادة تعرض البكتريا للإشعاع كما لوحظ أن الأشعة فوق البنفسجية قد حفزت بكتريا G. vaginalis على التطفير إذ بلغ تردد الطفرات 3.198×10^{-4} و 1.8×10^{-4} عند تعريض البكتريا لجرعة الإشعاع 20 جول/م^2 و 30 جول/م^2 على التوالي ، في حين كانت نسبة القتل أو نسبة البقاء المرافقة 9 % و 1.6 % بعد تعريض البكتريا لجرع الإشعاع السابقة نفسها و على التوالي . لذا يفضل استخدام الأشعة فوق البنفسجية و بجرعة 20 جول/م^2 لتطفير البكتريا على الرغم من أن تردد الطفرات في هذه المعاملة أقل مما هو عليه في المعاملة (30 جول/م^2) ، لأن نسبة البقاء بعد المعاملة الأولى (20 جول/م^2) أعلى مما هو عليه في المعاملة الثانية (30 جول/م^2) مما يكون ذا فائدة في الحصول على أعداد كبيرة و أنواع مختلفة من الطفرات الوراثية .

يتضح مما سبق أن بكتريا G.vaginalis R3 كانت حساسة لكلا المطفرين الفيزيائي (U.V) و الكيميائي (النتروسوجوانيدين) إلا أن حساسيتها للمطفر الأول كانت عالية جداً مقارنة بحساسيتها للمطفر الثاني ، كما أوضحت النتائج أن مادة النتروسوجوانيدين والأشعة فوق البنفسجية كانتا كفوءتين في تحفيز الطفرات الوراثية في هذه البكتريا إذ بلغ عدد مرات الزيادة في عدد الطفرات المستحدثة مقارنة بالطفرات التلقائية باستخدام النتروسوجوانيدين (بتركيز 30 مايكروغرام/مليلتر) 67.6 مرة وباستخدام الأشعة فوق البنفسجية (بجرعة 20 جول/م^2) 51.18 مرة .

و اعتماداً على ما سبق فإنه يمكن حث الطفرات في بكتريا G. vaginalis باستخدام المطفرات المباشرة (مثل النتروسوجوانيدين) أو غير المباشرة (مثل الأشعة فوق البنفسجية)إذ تسبب المطفرات المباشرة ازدواجاً خاطئاً (Miss Pairing) تحفز على التضاعف "الخاطئ للدنا" (10) ، في حين يعتمد التطفير بالمطفرات غير المباشرة على إصلاح الدنا المتضرر بواسطة نظام SOS ، و بهذا فإن الأخطاء الحاصلة في نوعية هذا الإصلاح هي التي تؤدي إلى حدوث الطفرات الوراثية (12).

إن حساسية البكتريا للتطفير بالمطفرات المباشرة و غير المباشرة في الوقت نفسه معروفة في بكتريا أخرى مثل بكتريا E.coli (11، 13) .

المصادر

1. Spiegel ,C.A.; Amsel, R.; Eschenbach, D.; Schoenknecht, F. and Holmes, K.K. (1980). Anaerobic bacteria in non specific Vaginitis. N. Eng. J. Med. 303(11): 601-605.
2. Chattopadhyay, B. (1984). The role of Gardnerella vaginalis in non – specific Vaginitis. J. Infect. 9 : 113-125.
3. Cauci,S.;Monte,R.;Quadrifoglio,F.;Ropele,M. and Menestrina,G.(1993).Ionic Factors regulating the interaction of Gardnerella Vaginalis hemolysin with red blood cell. Biochem. Biophys. Acta. 1153:53-58.
4. Cauci, S. ; Monte, R. ; Driussi, S. ; Lanzafame, P. and Quadrifoglio, F. (1998). Impairment of the mucosal immune system : IgA and IgM cleavage detected in vaginal washings of a subgroup of patients with bacterial vaginosis. J. Inf. Dis. 178 : 1698-170.
5. Holt, J. G. ; Krieg , N. R. ; Sneath , P. H. A. ; Staley , J. T. and Williams , S. T. (1994) . Bergeys Manual of determinative bacteriology . 9th edition . Williams and Wilkins Baltimore U. S. A.
6. Rottini ,G.;Dobrina,A.; Forgiarini,O.;Nardon,E.;Amirante,G.A. and Patriarca,P.(1990). Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by Gardnerella vaginalis. Infect. Immune 58(11):3751_3758.

الشكل (1): التـأثير القاتـل والمطفـر لمـادة N-methyl-N-Nitro-N-Notrosoguanindine علـى عزلـة بكتريـا *Gardnerlla vaginalis* (R3) فـي داري الفوسـفات (pH 5.7): A: منحني البقاء، B: تردد الطفرات.

الشكل (2): التاثير القاتل والمطفر للأشعة فوق البنفسجية علـى بكتريا *Gardnerlla vaginalis* (R3) المعلقة في وسط نقيـع الدماغ والقلب، A: منحني البقاء، B: تردد الطفرات.

7. Nicolı , H. ; Hammann ,R. , Salehnia , S. and Zilliken , F. (1984) . A newly discovered sialidase from Gardnerella vaginalis . Zentralbl-Bakteriol Microbiol Hyg. A. 258 (1): 72-76.
8. Blackwell,A. and Barlow ,D.(1982).Clinic diagnosis of anaerobic vaginosis (Non_specific vaginitis.Br.J.vener. Dis.58(6): 387_393
9. Catlin, B.w (1992) Gardnerella vaginalis : characteristic consideration and controversials. Clin. Micro. Rev. 5(3): 213 -237.
10. Radman, M.; Villani, G. , Boiteux, S. ; Kinsella,A.R. , Glickman,B.W. and Spadari,S. (1979). Replication fidelity: Mechanism of mutation avoidance and mutation fixation. Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology. 43:937 947.
11. Walker, C. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in E. coli . Microbiol. Rev. 48: 60-93.
12. Sedgwick, S. G. and yarranton , G . T . (1982). How cells in distress use SOS. Nature. 296: 606 - 607.
13. Bowring , S. N. and Morris , J . G . (1985). Mutagenesis of Clostridium acetobutylicum. J. Appl. Bacteriol. 58:577 584.
14. Carrasco,A. and Soto, C. (1987) . Mutagenesis of Clostridium butyricum. J. App. Bacteriol. 63: 539-543.
15. AL Saady, R.A. (2001). Bacteriological and Genetic Study for Gardnerella vaginalis(Local isolate). M.Sc. thesis. Collage of science. University of Baghdad.
16. Cerada-Olmedo-E.and Hana walt , P.C. (1967) . Macromolecular action of Nitrosoguanidine in E. coli .Biochem. Biophys. Acta. 142: 450-464 .
17. AL Bakri, G. H. and Umran , M. A. (1994) . Mutagenesis of a novel halo tolerant bacteria (Micrococcus spp.). Using Ultra violet light and N-Methyl-N-Nitro-N nitro guanidine . Iraq. J. Microbiol. 6: 55 – 63 .

Abstract

Optimum conditions for mutagenesis of Gardnerella vaginalis locally isolated using two mutagenic agents, MNNG (direct mutagene) and U.V radiation (indirect mutagene) were studied . It was found that both mutagenes were capable of inducing mutants in this bacterium.Treatment of bacteria with 30μg/ml MNNG in phosphate buffer (pH 5.7) for 1hr. are optimumconditions for inducing mutations in this bacteria with MNNG . While the optimum conditions for mutation with U.V radiation are by exposing of bacteria suspended in brain heart infusion broth to 20 J/m^2 of U.V radiation at a wave-length of 254 nm .