The Role of Nitrate and Bacterial Formation of Nitrosoamines in Water

Emtiazi, G., Biology Dept., University of Isfahan.

Habibi, M.H., Chemistry Dept., University of Isfahan.

ABSTRACT

Nitrosoamines or N-nitrosoamines are formed by the addition of an - NO group to secondary amines of other nitrosatable compounds. The majority of nitrosoamines are carcinogenic and some are extremely toxic. The carcinogenicity is associated with presence of nitrate and amine in water used for food or agricultural.

In Investigation of bacterial nitrosation, the caution has to be taken of using dead cells also as control.

In this research we have found that some microorganisms like Proteus mirabilis and E.coli are able to produce nitrosoamine from nitrate and amines in alkaline buffer but not in acidic pH.

Proteus mirabilis and E.coli causes nitrosation of Diethanolamine and morpholine in presence of nitrite or nitrate. Both nitrosomorpholine and nitrosodiethanolamine are stable and toxic to Pseudomonas aeuroginosa. Corinebacterium can proauce ammonium from nitrosoamine during 1-2 months however does not use nitrosoamine as the source of carbon and energy.

نقش نیترات و باکتری‌های تشکیل دهنده نیتروزوآمین در آبها

گیتی امتیازی * محمد حسین حبیبی **

چکیده:

ترکیبات نیتروزوآمین توسط انتقال گروه NO به گروه آمین تشکیل می‌شوند و شدیداً سرطان‌زا می‌باشند. حد مجاز نیتروژن به صورت نیترات در آبهای آشامیدنی وکشاورزی باید کمتر از حد ppm باشد. ولی با این حال بیشتر پسابهای صنعتی و آب رودخانه‌ها و آبهایی که مصارف کشاورزی و آبیاری دارند حاوی درصد بالایی از نیترات می‌باشند و به راحتی توسط سبزیجات جذب می‌شوند. امکان تشکیل نیتروزوآمین در مواد غذایی نیز وجود دارد چون در غذا، هم آمین و هم نیترات می‌تواند وجود داشته باشند.

در این تحقیق اثبات گردید که بعضی از میکروارگانیسم‌ها مانند پروتئوس و اشریشیاکلی قادر است در آب آشامیدنی حاوی نیترات تولید نیتروزوآمین کند. این ترکیب در pH اسیدی تولید نمی‌شود. در حالی که با افزایش pH تولید نیتروزوآمین افزایش می‌یابد و این واکنش توسط میکروارگانیسم‌ها در pH قلیایی صورت می‌گیرد.

پروتئوس و اشریشیاکلی واکنش نیتروزاسیون را با دی‌اتانل آمین و مورفولین در حضور NO^-_3 و NO^-_2 انجام می‌دهند چون قادرند NO^-_3 را به NO^-_2 تبدیل کنند. اگرچه نیتروزو مورفولین و نیتروزودی اتانل آمین پایدار می‌باشند و باعث جلوگیری از رشد پسودوموناس آئروژینوزا می‌شوند ولی در مدت یک یا دو ماه مقداری نیتریت و آمین از این ترکیبات توسط کورینه باکتریوم آزاد می‌شود، در حالی که کورینه باکتریوم رشد چندانی در محیط حاوی نیتروزو مورفولین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی ندارد.

مقدمه

واکنش‌های شیمیایی نیتروزوآمین ممکن است در pH اسیدی صورت بگیرد ولی واکنش‌های بیولوژیکی نیتروزوآمین معمولاً در pH اسیدی انجام نمی‌گیرد. هِر [۱] برای اولین بار در سال ۱۹۵۹ متوجه انجام واکنش‌های تشکیل نیتروزوآمین توسط باکتریها شد. در سال ۱۹۶۱ هِرمن [۲]

* استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان
** دانشیار گروه شیمی دانشگاه اصفهان

متوجه شد که چنین واکنش‌هایی توسط قارچ نیز انجام می‌گیرد. در سال ۱۹۶۸ سندر [۳] اعلام کرد که اکثر باکتریهای روده‌ای قادر به تشکیل این نوع واکنش می‌باشند. در سال ۱۹۸۵ کالملز [۴] نشان داد که در محیط آب و خاک بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادر به تشکیل چنین واکنش‌هایی می‌باشند. به همین جهت وجود نیتریت و یا میکروارگانیسم‌های احیاکننده نیترات و همچنین ترکیبات آمین موجود در آب در تشکیل چنین واکنش‌هایی مؤثر می‌باشند. در سال ۱۹۷۴ تانن‌بام نشان داد که نیتریت موجود در بزاق دهان در تشکیل نیتروزوآمین مؤثر است [۵]. همچنین در سال ۱۹۸۴ نشان داده شد که باکتریهای روده‌ای در تشکیل این ترکیبات مؤثر می‌باشند [۶]. در پساب چرم‌سازی باسیلوس‌ها نقش مهمی در تشکیل ترکیبات نیتروزوآمین دارند [۷]. در سال ۱۹۸۸ و ۱۹۹۵ نشان داده شد که دی‌آمینونفتالین توسط اشریشیاکلی و نایسریا به نیتروزوآمین تبدیل می‌شود [۸ و ۹]. اگرچه این ترکیبات پایدار می‌باشند ولی در سال ۱۹۹۰ ونر میکروارگانیسمی راکه قادر به تجزیه نیتروزوتری استیک اسید در شرایط دنیتریفیکاسیون بود جداکرد [۱۰]. در سال ۱۹۷۳ تجزیه نیتروزوتری استات توسط پسودوناموس گزارش شد [۱۱]. گزارشات بسیاری در مورد جهش‌زایی این ترکیبات وجود دارد [۱۲ و ۱۳]. یکی از دلایل ایجاد سرطان توسط سیگار نیز تشکیل نیتروزوآمین می‌باشد. در سال ۱۹۷۵ این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی تولید شده‌اند [۱۴]. با وجود آنکه گزارشهایی مبنی بر تجزیه این ترکیب به وسیله باکتریهای روده‌ای وجود دارد ولی pH اسیدی و احتمالاً اسید آسکوربیک در جلوگیری از تشکیل نیتروزوآمین و جلوگیری از سرطان دستگاه گوارش نقش مهمی دارد [۱۵]. بهترین وسیله برای جلوگیری از بروز این نوع واکنش حذف نیتریت از آب می‌باشد [۱۶]. در این تحقیق نیز نشان داده شد که وجود نیترات در آب نقش مؤثری در تولید نیتروزوآمین دارد.

روش آزمایش

۱- آزمایش سنجش مورفولین

برای تعیین وجود مورفولین در نمونه مورد آزمایش، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۱٪ وزنی نفتوکوئینین و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار هیدروکسیدسدیم به نمونه مورد آزمایش اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه ظهور رنگ نارنجی نشانهٔ وجود مورفولین و پی‌پیرازین و رنگ زرد نشانهٔ تجزیه آن می‌باشد (منحنی استاندارد آن رسم گردید).

۲- آزمایش سنجش دی‌اتانل آمین

دی‌اتانل آمین به وسیله روش دوبین تعیین گردید [۱۷]. در این روش از ۲ و ۴ دی نیتروفلور بنزن به عنوان معرف استفاده می‌شود این معرف با دی‌اتانل آمین کمپلکس زرد رنگی می‌دهد که در طول موج ۳۸۰ نانومتر قابل اندازه گیری می‌باشد. منحنی استاندارد این ماده رسم گردید.

۳- روش اندازه گیری نیتریت

میزان نیتریت به عنوان رنگ سنجی طبق روش استاندارد استفاده از اسید سولفانیلیک و آلفا نفتیل آمین تعیین و منحنی آن رسم گردید.

۴- نقش pH در تولید نیتروزوآمین

به محیط پایه حاوی مورفولین ۱۰ mM و نیتریت با pH معادل ۷ مقدار ۰/۱ میلی‌مول سیانات برای افزایش pH اضافه شد. اسیدسیتریک ۱ M برای کاهش pH به محیط اضافه شد. به این محیط به مقدار ۲ کلنی پروتئوس و اشریشیاکلی اضافه شد و مقدار مورفولین و دی‌اتانل آمین همزمان با رشد باکتری اندازه گیری شد.

۵- آنالیز نیتروزوآمین

وجود نیتروزوآمین به وسیله کروماتوگرافی گازی (GC) در محیط تأیید گردید.

۶- تأثیر نیتروزوآمین بر رشد پسودوموناس آئروژینوزا[1]

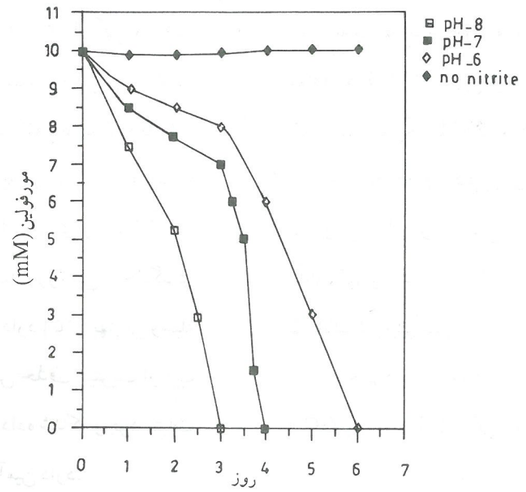
یک محیط کنترل حاوی سوکسینات (۱۰mM) و محیط حداقل پایه تهیه گردید، دو محیط دیگر حاوی سوکسینات و ۱۰mM نیتروزو دی اتانل آمین و ۱۰mM نیتروزو مورفولین آماده گردید. هر سه محیط کشت با ۱۰mL محیط آبگوشت اولیه که در محیط سوکسینات تهیه شده بود تلقیح گردید و توسط کدورت سنجی رشد باکتری و اثر سمی نیتروزوآمین بر رشد این میکروارگانیسم بررسی شد.

نتایج

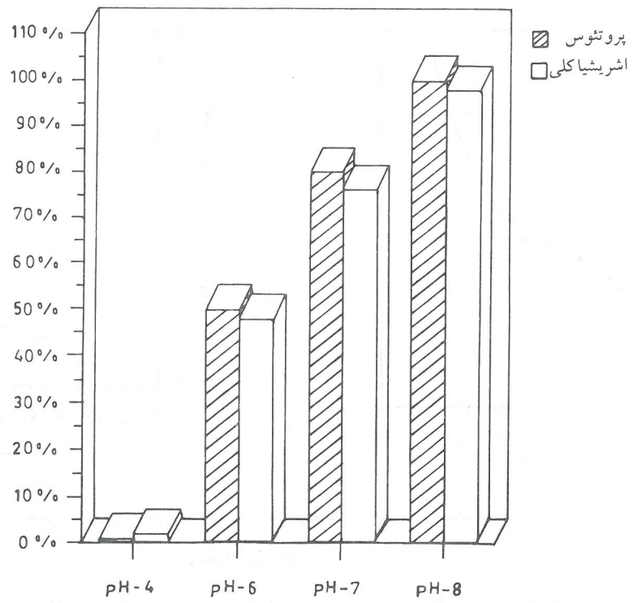
پروتئوس و اشریشیا کلی قادر به رشد در محیط دی‌اتانل آمین می‌باشند ولی در محیط واجد مورفولین به عنوان تنها منبع کربن هیچکدام رشد ندارند در حالی که مورفولین هیچگونه اثر سمی روی این میکروارگانیسم‌ها و یا باکتریهای دیگر مانند پسودوموناس ندارد [۱۸]. ولی در محیط حاوی گلوکز و نیتریت کاهش مورفولین در اثر مصرف باکتری نمی‌باشد بلکه علت تبدیل آن به نیتروزو مورفولین است و آنالیز توسط G.C وجود نیتروزو مورفولین را در محیط تأیید می‌کند. همانطور که در شکل (۱) مشخص است در محیط حاوی گلوکز در حالی که باکتری رشد دارد میزان مورفولین در pHهای مختلف کاهش می‌یابد در حالی که کاهش مورفولین در pH قلیایی سریع‌تر است و نمایانگر تأثیر pH در واکنش تشکیل نیتروز می‌باشد. نکته جالب در این آزمایش این است که بدون وجود نیتریت کاهش مورفولین مشاهده نمی‌شود و چون این میکروارگانیسم‌ها احیاءکننده نیترات می‌باشند به شرط وجود نیترات نیز قادر به تولید نیتروزو مورفولین از مورفولین می‌باشند.

حداکثر نیتروزو دی اتانل آمین تولیدی توسط پروتئوس و اشریشیا کلی در pH های مختلف تعیین شد و مشخص گردید که در pH=۸ درصد بالایی از نیتروزو دی‌اتانل آمین تولید می‌شود شکل (۲). باید یادآور شد که چون باکتری‌ها تجزیه کنندهٔ دی‌اتانل آمین می‌باشند مقدار ۱ میلی‌لیتر از میزان 10^8 باکتری به محیط پایه حاوی ۱ میلی‌مول دی‌اتانل آمین اضافه شد و درصد وجود نیتروزوآمین توسط GC مشخص گردید.

1- Pseudomonas Aeuroginosa



شکل (۱): کاهش میزان مورفولین در محیط پایه حاوی گلوکز (5mM)، مورفولین (10mM) و نیتریت (mM) در pH مختلف توسط پروتئوس (در محیط فاقد نیتریت pH=۸ هیچگونه کاهش در میزان مورفولین دیده نمی‌شود).
اعداد میانگین سه تکرار است (چنین تغییراتی در محیط فاقد باکتری دیده نشد).

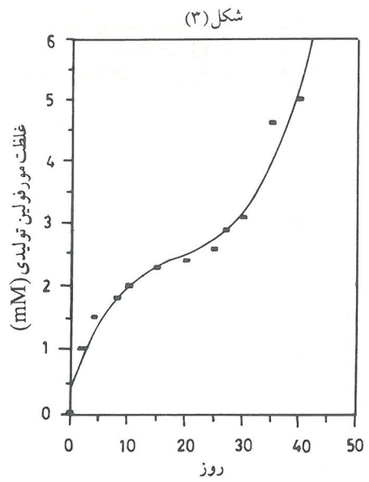


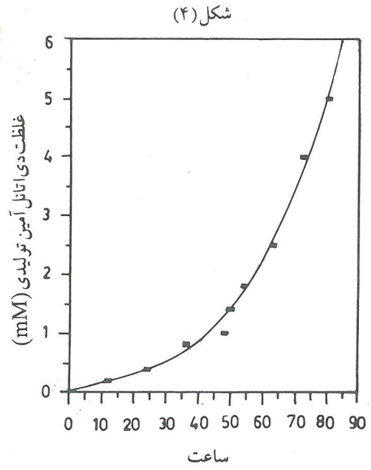
شکل (۲): میزان تولید نیتروزو دی اتانل آمین در pH مختلف پروتئوس و اشریشیا کلی
(چنین واکنشی توسط کلرورجیوه ۱/۰ درصد متوقف می‌شود)

با وجود آنکه میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید مواد سرطانزا از ترکیبات آمین، نیترات و یا نیتریت موجود در آب می‌باشند ولی بعضی از میکروارگانیسم‌ها مانند کورینه باکتریوم[1] قادر به تجزیه این مواد می‌باشند. میزان تولید مورفولین و دی‌اتانل آمین توسط کورینه باکتریوم در شکل (۳ و ۴) نشان داده شده است. لازم به تذکر است که کورینه باکتریوم در محیط حاوی مورفولین و دی‌اتانل آمین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی قادر به رشد نمی‌باشد در حالی که می‌تواند نیتروزوآمین را تجزیه کند که این عمل احتمالاً به علت سیستم آنزیمی این میکروارگانیسم برای کاهش سمیت این مواد می‌باشد لازم به ذکر است که در نمونه شاهد که فاقد میکروارگانیسم بود این تغییرات دیده نشد. به طوری که در شکل (۵) نشان داده شده است حضور نیتروزوآمین در محیط پایه حاوی سوکسینات (۱۰mM) رشد پسودوموناس آئروژینوزا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود نیتروزو مورفولین اثر سمی بیشتری نسبت به نیتروزو دی‌اتانل آمین دارد. این امر احتمالاً به آن دلیل است که کورینه باکتریوم قادر به تبدیل این مواد می‌باشد در حالی که پسودوموناس آئروژینوزا سیستم آنزیمی تبدیل نیتروزوآمین به آمین را ندارد.

نکته قابل توجه این است که اشریشیا کلی قادر به رشد در محیط دی‌اتانل آمین به عنوان تنها منبع کربن -انرژی و آمونیاک می‌باشد. کاهش دی‌اتانل آمین و افزایش رشد در شکل (۶) نشان داده شده است در حالی که با وجود نیتریت در pH=۸ این رشد متوقف می‌شود که احتمالاً به علت تولید نیتروزوآمین می‌باشد. در شکل (۷) کاهش دی‌اتانل آمین و نیتریت نشان داده شده است. با وجود آنکه اشریشیا کلی مصرف کننده دی‌اتانل آمین می‌باشد ولی در این محیط رشدی ندارد. این تحقیق نمایانگر آن است که وجود نیترات و یا نیتریت می‌تواند در تولید ترکیب‌های سرطانزای نیتروزوآمین دخالت داشته باشد. بهترین روش کنترل تشکیل چنین ترکیباتی در مواد غذایی، کرم‌های آرایشی و پساب جهت آبیاری کشاورزی، حذف کامل نیتریت و نیترات در آبها می‌باشد.

1- Corynebacterium



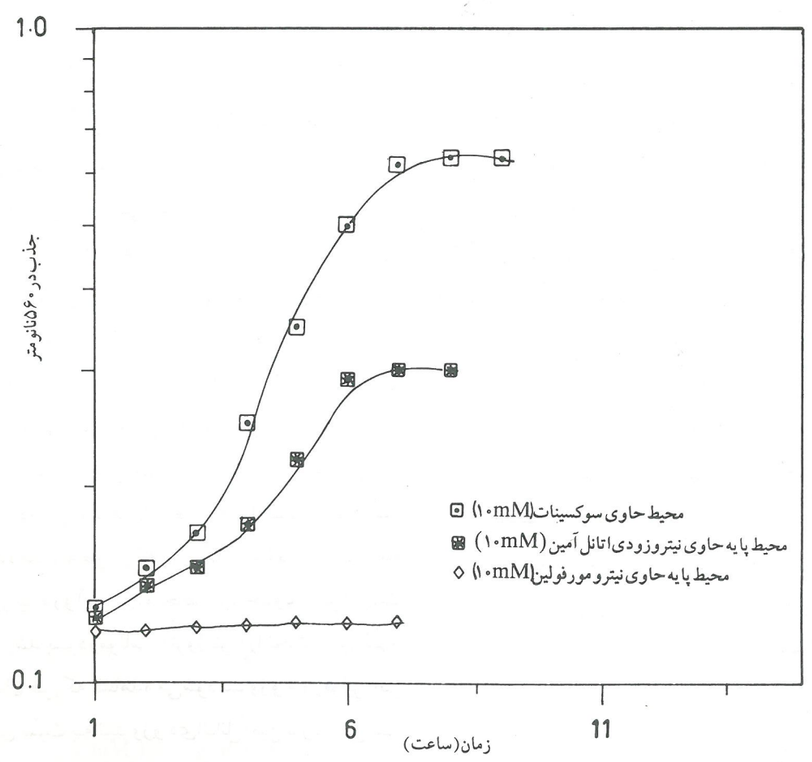


شکل (۳): تولید مورفولین در اثر تجزیه نیتروزومورفولین در محیط پایه حاوی گلوکز و نیتروزومورفولین

توسط کورینه با کتریوم

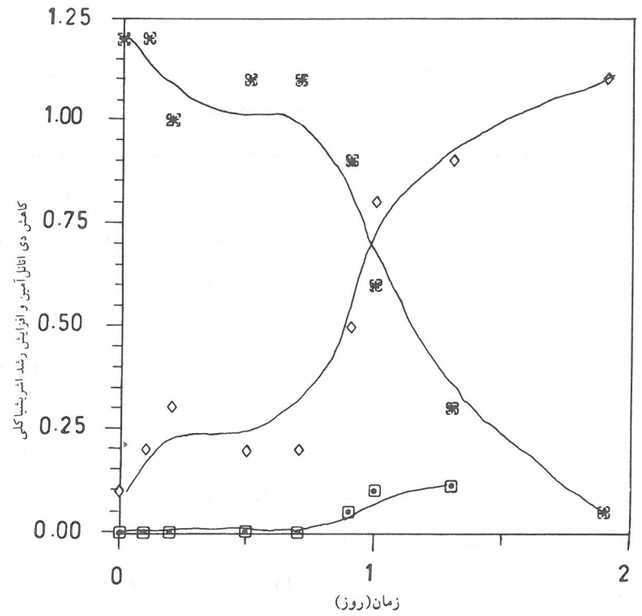
شکل (۴): تولید دی اتانل آمین در اثر تجزیه نیتروزودی اتانل آمین در محیط پایه حاوی گلوکز و نیتروزودی اتانل آمین

توسط کورینه با کتریوم



شکل (۵): اثر بازدارندگی نیتروزوآمین (۱۰ mM) در محیط پایه حاوی سوکسینات (۱۰mM)

روی رشد پسودوموناس آئروژینوزا



افزایش رشد اشریشیا کلی در حضور ۱ mM نیتریت (OD 560) ⊡

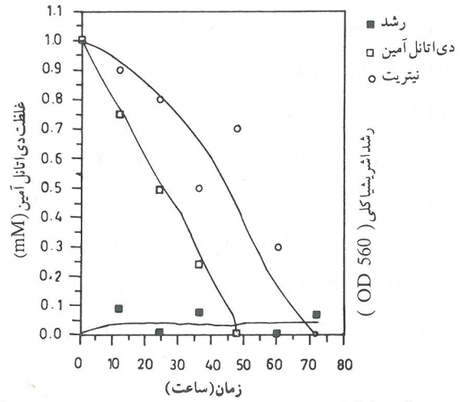
(غلظت دی اتانل آمین ۱ mM) ⊠

افزایش رشد اشریشیا کلی بدون نیتریت (OD 560) ◇

شکل (۶): رشد اشریشیا کلی در محیط حاوی دی اتانل آمین (۱mM) همراه با نیتریت (۱mM) و بدون آن

بحث

بعضی از میکروارگانیسم‌ها قادر به تبدیل نیترات به نیتریت می‌باشند و برخی از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند آمینها را در حضور نیتریت به نیتروزوآمین تبدیل نمایند. در این تحقیق نشان داده شد که در صورت وجود نیترات، اشریشیا کلی و کلبسیلا قادر به تولید ترکیب نیتروزوآمین می‌باشد. با وجود آنکه ترکیب نیتروزوآمین همراه با کاتالیزور در pH اسیدی تولید می‌شود ولی در حضور با کتریها pH قلیایی صورت می‌گیرد و چون این با کتریها در جدار روده نیز یافت می‌شوند وجود نیترات در آب و حتی آبهای کشاورزی می‌تواند منجر به تولید نیتروزوآمین در آب شود. از طرف دیگر ترکیبات نیتروزوآمین در pH قلیایی بسیار پایدار بوده و برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله پسودوموناس سمی می‌باشند.



شکل (۷): کاهش دی اتانل آمین (۱mM) و نیتریت (۱mM) توسط اشریشیا کلی در حالی که افزایش رشد وجود ندارد

در حالی که در این تحقیق نشان داده شده است که کورینه باکتریوم بعد از مدت طولانی بدون آنکه رشدی در نیتروزو مورفولین داشته باشد و بتواند از آن به عنوان تنها منبع انرژی و نیتروژن برای رشد استفاده کند قادر می‌باشد مقداری آمین از ترکیب نیتروزو مورفولین آزاد نماید. باید متذکر شد که در نمونه کنترل که واجد باکتری مرده می‌باشد هیچگونه آمینی آزاد نمی‌شود بنابراین میکروارگانیسم‌ها در شرایط خاصی و یا شاید به صورت کومتابولیسم و یا سی‌نرژیسم بتوانند ترکیبات نیتروزوآمین را تجزیه نمایند ولی چون تجزیهٔ این ترکیبات کند می‌باشد، باید به حذف نیترات از آبهای آشامیدنی و کشاورزی توجه خاصی شود.

منابع و مراجع

1- Herr, R.R., Eble, T.E., Bergy, M.E. and Jaknke, K.K. (1959). " *Isolation and Characterisation of Streptozoticin* " Antibiotics. Annual 236-240.

2- Herrmann, J. (1961). " *Identifiziernung Eines Stoffwechselproduktes Von Clitocybe Suavolens als 4- methyitrosamino - benzaldehyd* " - Hoppe - Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie, 326, 13-16.

3- Sander, J. (1968). " *Nitrosaminsynthese Durch Bakterien* ". Hoppe - Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemite, 349, 429-432.

4- Calmels, S., Ohshima, H., Vincent, P., Gounot, A-M. and Bartsch, H. (1985). " *Screening of Microorganisms for Nitrosation Catalysis at pH 7 and Kinetic Studies on Nitrosamine Formation from Secondary Amines by E.coli Strins.* " Carcinogensis 6, 911-915.

5- Tannenbaum, S.R., Snskey, AJ., Weisman, M and Bishop, W. (1974)." *Nitrite in Human Saliva. It's Possible Relationship to Nitrosamine Formation* ". Journal of the National Cancer Institue, 53, 79-84.

6- Suzuki, K., Mitsuoka, T. (1984). " *N - Nitrosamine Formation by Intestinal Bacteria IARC Scientific Publication No. 57-N-nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer* " pp. 275-281.IARC,Lyon.

7- Smith, H.A. (1992). " *Nitrate Reduction and ATNC Formation by Brewery Wild Yeasts* ", Journal the Institute of Brewing 98, 415-420.

8- JI, X.and Hollacher, T.C. (1988). " *Mechanism for Nitrosation of 2,3 Diaminonaphthalene by Escherichia coli: Enzymatic Production of NO Followed by* O_2 *Dependent Chemical Nitrosation* " Applied and Environmental Microbiology, 54, 1791-1794.

9- Brew, F., Forsythe, S. (1995). " *The Rapid Nitrosation of 2,3 Diaminonaphthalene by Gastric Isolates Neisseria Subflava* ", Letters in Applied Microbiology, 10, 39-42.

10- Wanner, U., Kemmler, J., Weilenmann, H-U, Egli, T., EL-Banner, T. and Auling, G. (1990). " *Isolation and Growth of a Bacterium Able to Degrade Nitrilotriacetic Acid under Denitrifying Conditions*" . Biodegradation 1, 31-41.

11- Cripps, R.E., Noble, A.S. (1973). " *The Metabolism of Nitrilotriacetate by a Pseudomonad* ". Biochemical Journal 136, 1059-1068.

12- Shank, R.C. (1975). " *Toxicology of N-Nitroso Compounds* ", Toxicology and Applied Pharmacology, 31, 361-368.

13- Sen, N.P., Smith, D.C. and Schwinghamer, L. (1969). " *Formation of N-Nitrosamines form Secondary Amines and Nitrite in human and Animal Gastric Juice* ", Food and Cosmetics Toxicology, 7, 301-307.

14- Hashimoto, S., Kawai, Y. and Mutai, M. (1975). " *In Vitro N- Nitrosodimethylamine Formation by some Bacteria* ". Infection and Immunity, 11, 1405-1406.

15- Mirvish, S.S., Wallcave, L., Eagen, M. and Scubik, P. (1972). " *Ascorbate - Nitrite Reaction: Possible Means of Blocking the Formation of Carcinogenic N-Nitroso Compounds,* " Science 177, 65-67.

16- Madugwu, E.N. (1981). " *Observations, in Vitro on N-Nitrosation by in Tracellular Extracts of some Microoganisms Isolated from Palm Wine,*" Toxicology Letters 7, 341-346.

17- Dubin, T.D., (1960). " *The Assay and Characterization of Amines by Means of 2,4 - Dinitrofluorobenzen,* " The Journal of Biological Chemestry, 235 (3), 783-786.

18- Dodson, J.J., Bitterman, M.T. (1989). " *Compound Uniqueness and the Interactive Role of Morpholine in Fish Chemoreception* ", Biology of Behaviour, 14, 13-27.