تطوير نظام بكتري لتحديد المطفرات في البيئة والأغذية
أولا: التطفير بالمطفر القياسي Nitrosoguanidine

غيث لطفي العزاوي* زهرة محمود الخفاجي** ورقاء يحيى المشهداني*

أثير احمد مجيد الحسن*

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٥/٣/٦

الخلاصـــة

تم انتخاب ثلاثة عزلات من التربة صنفت كالاتي : *Bacillus* G3 مكونة للابواغ ، G12 تعود الى جنس *Arthrobacter* و G27 هي من جنس *Brevibacterium* كلها حساسة للستربتومايسين والريفامبيسين . اختبرت العزلات من حيث حساسيتها لصبغة البلور البنفسجي وكانت حساسة ولكن أكثرها حساسية G3.

استخدم المطفر المعروف N- methyl N- nitro – N– nitrosoguanidine (NTG) بتراكيز متدرجة 5 , 10 , 50 , 75 , 100 مايكروغرام / مللتر لمعرفة حساسية العزلات له وتأثير حثه للطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين باعتبارهما من الواسمات الكروموسومية عند استعماله لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ م.

ادت المعاملة بالـ NTG الى قتل جزء من الخلايا للعزلات الثلاث بدرجات متفاوتة . كما أدت المعاملة الى حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين ، وطفرات مضاعفة (طفرات مقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين في آن واحد) في العزلة G27 فقط . لوحظت زيادة في تردد الطفرات بزيادة تركيز المطفر .

تم مقارنة قابلية العزلات للتطفير بالـ NTG (Relative mutability) (*Rmt*) وكانت العزلة G12 اكثر العزلات قابلية للتطفير ، وعند حساب حساسية العزلات النسبية Relative mutational sensitivity (*Rms*) كانت العزلة G12 اكثر العزلات حساسية ايضا .

المقـــدمة

زادت في الآونة الأخيرة الملوثات البيئية والتي انعكست على صحة الإنسان متمثلة بزيادة الاصابة بالسرطان ، ونظرا للعلاقة الوثيقة بين التسرطن والتطفير فان الأنظمة البسيطة مثل البكتريا يمكنها الكشف عن المواد المسرطنة (١،٢،٣)لذلك تم تطوير العديد من الأنظمة البكترية للكشف عن المطفرات (٤) . ومن أهم أهداف فحص التطفير هو تحديد الكشف عن الفعالية التطفيرية للمواد والتي توجد في البيئة والتربة (٥) وذلك لان التسمم الوراثي Genotoxicity يظهر بشكل طفرات والتي عند حدوثها في الخلايا الجسمية تؤدي الى حدوث السرطانات (٦)وقد اصبح فحص التطفير باستعمال الأحياء المجهرية مقبولا بشكل واسع للتعرف على مدى خطورة المواد والمسرطنات ، اذ يمكن أن تكون وسيلة للحدس الكمي لقوة المسرطنات (٧،٨) سواء كانت هذه المسرطنات بيئية أو عند تحديد صلاحية المواد والأدوية وغيرها (٩).

استهدفت الدراسة الحالية (والتي هي ضمن سلسلة من الدراسات) لإيجاد نظام بكتيري للكشف عن المطفرات بمواصفات خاصة .

المواد وطرق العمل

الأوساط الغذائية والمحاليل

- وسط اكار أساس الدم Blood agar base من شركة England / Mast
- وسط المرق المغذي Nutrient broth من شركة Germany /Merck
- محلول التخفيف ،استعمل 0.1 % من التربتون (Oxoid) في الماء المقطر
- محلول داري ء الفوسفات : حضر بتركيز ٠,٠٥ عياري وعدل الاس هيدروجيني الى ٥,٥ باستعمال محلول عياري من حامض الهيدروكلوريك (HCl).

*معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا – جامعة بغداد

**دكتوراه – استاذ مساعد – معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية – جامعة بغداد

المضادات الحيوية

* الستربتومايسين استعمل بشكل كبريتات الستربتومايسين Streptomycin sulphate من شركة India Ajanta

• الريفامبيسين Rifampicin من معمل الأدوية في سامراء (SDI) العراق.

• صبغة البلور البنفسجي Crystal violet من شركة BDH/ England

المطفر: استعمل N- methyl-N- (NTG) nitro- N-nitrosoguanidine/شركة Fluka / سويسرا.

العزلات البكترية:

عزل عدد من البكتريا من نماذج تربة من مناطق بعيدة عن مصادر التلوث والحاضرة، تم إجراء التخافيف اللازمة وزراعتها على وسط اكر أساس الدم وحضنت بدرجة ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة للحصول على مستعمرات معزولة.

• اختيار تركيز المضاد والحيوي:

تم باستعمال طريقة التدرج بالتركيز في الأطباق (١٠).

اختبار الحساسية لصبغة البلور البنفسجي: استعملت تراكيز متدرجة من الصبغة ٢،٣،٤،٥،٦،٧ملغرام /ملتر وحددت حساسية العزلات باستعمال طريقة الأقراص الورقية (١١).

تحديد عدد البكتريا الحي (Viable count): تم باستعمال الطرق المعتمدة في هذا المجال (١٢)

اختبارات التطفير:

تم تحضير مزروع لوغارتيمي للعزلات التي تم انتخابها في وسط المرق المغذي الى كثافة ضوئية OD_{600} بحدود ٠,١٥ -٠,٢٥. فصلت الخلايا عن الوسط بالطرد المركزي وغسلت الخلايا بمحلول دارئ الفوسفات باس هيدروجيني ٥,٥ ثم علقت بنفس الحجم من دارئ الفوسفات وقسمت إلى عدة أقسام بحجم ٥ مللتر، وحدد العدد الحي للخلايا في وقت الصفر، ثم عوملت النماذج بتراكيز متدرجة من NTG (٥،١٠،٥٠،٧٥،١٠٠)مايكروغرام/مللتر لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ٣٧ م، بعد ذلك فصلت الخلايا من المحلول وغسلت بمحلول دارئ الفوسفات ثم علقت وحدد العدد الحي بعد المعاملة مباشرة ،وكذلك زرعت النماذج على أوساط حاوية على الستربتومايسين والريفامبسين لتحديد الطفرات المقاومة. ثم حصنت النماذج بدرجة٣٧ م لليوم الثاني لغرض التعبير الظاهري Phenotypic expression (١٣) وفي اليوم التالي تم تحديد عدد الخلايا الحي وكذلك تم تحديد عدد الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية الستربتومايسين (١٠ مايكروغرام/ مللتر) الريفامبسين (٢٠ مايكروغرام/ مللتر) و ستربتومايسين + ريفامبسين (١٣، ١٤).

الحسابات

أجريت الحسابات وفق المراجع الخاصة (١٥)

١. 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)

٢. حدد Lethal hits (Hx) وفق المعادلة

$Sx = exp\,[-Hx]$

٣. تردد الطفرات Mutant frequency (Mx)

$Mx = N_m x/No$

$N_m x$ عدد الطفرات المستحثة عند التركيز x

٤. حاصل الطفرات Mutant yield (Yx)

$Yx = N_m x/No$

٥. أعلى حاصل للطفرات عند تركيز معين أو عند اقل تركيز مستعمل Y_{max}

$Yx = Nmx/No$

٦. قابلية الخلايا للتطفير النسبية (Rmt)Relative mutability

$Rmt = Y_{max}/Hx$

٧. حساسية التطفير النسبية (Rms)Relative mutational sensitivity

$Rms = Y_{max}/x$

٨ كفاءة المطفر Mutagen efficiency

Mut . Eff. =No. of mutants/ml /µg mutagen

النتائج والمناقشة

تم عزل حوالي ٦٠ عزلة من التربة وقد اختيرت بعض العزلات الملائمة لعمليات التطفير التي وضعت لها عدة مؤشرات منها الحساسية للستربسومايسين والريفامبسين باعتبارهما من الصفات الكروموسومية (Chromosomal genetic markers)(١٦) وذلك لثباتية الصفات الكروموسومية مقارنة بالصفات المحمولة على البلازميدات التي يمكن ان تفقد بتكرار عمليات الزرع او غيرها من الظروف . وقد وجد ان التراكيز الملائمة من المضادات ١٠ مايكروغرام /مللتر و ٢٠ مايكروغرام مللتر للستربتومايسين والريفامبسين على التوالي ، وقد تم التأكد من صفة المقاومة وثباتها بعد إعادة الزرع اكثر من ٢٠ مرة .

أما المؤشرات الأخرى للاختيار فهي تفاعل الخلايا مع صبغة كرام حيث اختيرت العزلات الموجبة لصبغة كرام لتلافي مشكلة نضوحية الأغلفة الخارجية التي تشكل مشكلة دائمة في البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي أدت بايمس والعاملين معه عند تطوير نظام بكتريا *Salmonella typhimurium* الى استعمال طفرات *raf* التي حذف فيها بعض مكونات الطبقات الخارجية (2 , 17) . بالإضافة إلى أن العزلات التي تم انتخابها هي ذات نمو متجانس في الأوساط السائلة لضمان توزيع المطفرات بشكل متجانس عند المعاملة ، وهذه العزلات المنتخبة تكون مستعمرات بحجم مقبول على سطح الوسط الغذائي الصلب . وقد فضلت العزلات غير المكونة للابواغ . لان الطور البوغي يختلف بشكل كبير عن الطور الخضري (18) والعزلات التي انتخبت أطلق عليها G_1 وهي عصيات موجبة لصبغة كرام مكونة للابواغ ، مستعمراتها دائرية جافة خشنة المظهر ، تكون أغلبية خلاياها في الوسط السائل مفردة ولكن توجد فيها التجمعات الثنائية وسلاسل قصيرة . أما العزلة الثانية G_{12} وهي عصيات موجبة لصبغة كرام غير مكونة للابواغ والأغلبية العظمى في الوسط السائل مفردة وقد لوحظت بعض التجمعات الثنائية وسلاسل قصيرة . العزلة الثالثة G_{27} موجبة لصبغة كرام غير مكونة للابواغ والغالبية العظمى تكون بشكل مفرد مع نسبة ضئيلة من الخلايا ثنائية التجمع والسلاسل القصيرة .

وقد تم فحص نفاذية الأغشية البكتريا لصبغة البلور البنفسجي وذلك لان بعض المطفرات لايمكن أن تحث الطفرات نظرا لعدم إمكانية نفوذها إلى داخل الخلية ، لذلك تم اختيار العزلات المنتخبة لنفاذ البلور البنفسجي (الوزن الجزيئي 407.996) الذي يعد من المثبطات لنمو البكتريا فقط عند دخولها الى داخل الخلية (2, 19) . ويلاحظ من الشكل ١ تأثر الصبغة في العزلات الثلاثة ويلاحظ أن العزلات حساسة للصبغة البلور البنفسجي ولكن بمستويات مختلفة نوعا ما ، ولذلك يمكن أن تستعمل لفحص المطفرات على أساس الوزن الجزيئي . وقد تم تشخيص العزلات وفق المراجع الخاصة (20) وكانت كالاتي G3هي *Bacillus* spp ، *Arthrobacter* spp G12 و G27 تعود الى جنس *Brevibacterium*

أما تأثير المطفر NTG الذي يعد من المطفرات القوية وهو من مجموعة العوامل المؤلكلة (Alkylating agents) (12 ،21)، فيوضح الشكل2 تأثير المطفر على عيوشية الخلايا المتبقي (*Sx*) Survival fraction الذي يعد من المؤشرات الواضحة لتأثير المطفر (شكل ٢ /أ للعزلة G3 ، 2/ب العزلة G12، 2/جـ للعزلة G27) ويتضح أن الجزء المتبقي *Sx*يقل بزيادة تراكيز NTG الذي يكون معتمدا على عدد الأهداف القاتلة *Hx* ويتعاكسان في القيم . والحقيقة أن التأثير القاتل للمطفر لا يعول عليه كثيرا وذلك لان عمليات التطفير والقتل هي عمليات تقريبا مستقلة (15)، كما أن NTG يعطي تردد عالي عندما يكون القتل بحدود ٥٠% ولكن هذا يختلف عن المطفرات الاخرى مثل الأشعة فوق البنفسجية (12)

أما الشكل ٣/ب فيوضح عدد الطفرات المقاومة للستربتومايسين المقاومة للريفامبسين المستحثة في العزلات الثلاث . أما الشكل 3/جـ فيوضح حث الطفرات المضاعفة أي المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين سويا بالنسبة للعزلة G27 فقط حيث إن العزلات الأخرى لم تحث فيها مثل هذه الطفرات المضاعفة.ويلاحظ بصورة عامة حصول استجابة للتراكيز المتدرجة من المطفر وان كانت بدرجات متفاوتة بالنسبة للعزلات وهذا يؤكد ان NTG من المطفرات القوية في هذه العزلات إذ أن النتائج الموضحة كانت لمعاملة استمرت لمدة 15 دقيقة لتلافي عمليات القتل غير المتخصصة عند استعمال التراكيز العالية (2 , 12 , 22)

أما كفاءة NTG في حث الطفرات(طفرة /مايكروغرام) في العزلات الثلاث فموضحة في الشكل 4/أ الخاص بالمقاومة للستربتومايسين والشكل ٤/ب الخاص بالطفرات المقاومة للريفامبسين وقد وجد ان مضاعفة التراكيز (10 مرات) يؤدي إلي زيادة كفاءة المطفر التي كانت

متناسقة سواء في الطفرات المقاومة للستربتومايسين او الريفامبسين في العزلات G_3 ، G_{12} ولكن لم تكن متكافئة مع زيادة التراكيز حيث زاد التركيز عشرة أضعاف ولم تكن هناك زيادة عشر أضعاف في عدد الطفرات اي أن الزيادة لم تكن بشكل طردي ما عدا العزلة G_{12} في حالة الطفرات المقاومة للستربتومايسين. أما العزلة G_{27} كان الازدياد في عدد الطفرات لتراكيز اقل من 100 مايكروغرام/مللتر حيث تم حث ٦٢٦,٩٧ طفرة للتركيز ٤/ب. ان كفاءة NTG في حث الطفرات المقاومة للريفامبسين مختلفة نوعا ما حيث يلاحظ زيادة في عدد الطفرات ولكن ليس بشكل علاقة خطية وذلك لان التطفير بـ NTG ليس هو تفاعل كيميائي بين NTG ، DNA وانما التطفير يحتاج إلى بعض المكونات الخلوية (23) وهذا يصح بالنسبة للعزلة G_3، G_{12} فقد وجد ان التراكيز الواطئة تسمح بالتضاعف بشكل طبيعي ولكن تكون ذات تاثير مطفر (٢٤) . أما العزلة G_{27} فتظهر حساسيتها بشكل واضح فقد استحث فيها الطفرات بتركيز 10 مايكروغرام /مللتر عشرات أضعاف ما يقابلها بالنسبة للعزلتين الاخريتين بالنسبة للريفامبيسن. أما زيادة التركيز الى 100 مايكروغرام /مللتر فقد أدى إلي انخفاض الطفرات المقاومة للريفامبسين وذلك لان هذه العزلة قد عانت حث عدد كبير من الطفرات المقاومة للريفامبسين إذ وصل العدد الى 1987.7 /مللتر عند تركيز 50 مايكروغرام بكفاءة تصل إلى 39.8 طفرة لكل مايكروغرام ، وقد تكون هذه الحالة ناتجة عن استمرار حدوث الطفرات ولكن البعض منها يكون بمثابة طفرات مخمدة Suppressor mutation وبالتالي يؤدي إلى ظاهرة انحدار تكرار الطفرات Mutation frequency decline (MFD)(25) وهذا ما يؤكده الناتج عند الرجوع الى الشكل 2/جـ حيث يتضح أن هذه العزلة هي الوحيدة التي حث فيها طفرات مضاعفة مقاومة للستربتومايسين والريفامبسين . ويستنتج من هذه الفقرة إن NTG له تاثير اكبر في حث الطفرات المقاومة للريفامبسين وربما يعود ذلك لاتساع المنطقة الوراثية الخاصة بالمقاومة للريفامبسين إذ أن المقاومة تعود إلي تأثير المضياد على الوحدة β من إنزيم كوثرة RNA (RNA polymerase) المكون من أربعة وحدات وهي β، α2β ولذلك يعتقد ان التأثير على أي من الوحدات يؤدي إلى اختلال تداخل الوحدات وانتاج أنزيم فعال (26 ، 4) .

مما تقدم يتضح ان NTG الذي يعد من المطفرات القوية (12 ، 21) قد اثر بشكل كبير على العزلات وتغير أنماطها الوراثية وربما ساعد في ذلك ان وزنه الجزيئي قليل 147وبهذا يسهل نفاذه مقارنة بالبلور البنفسجي الذي نفذ وقتل الخلايا (شكل ١).

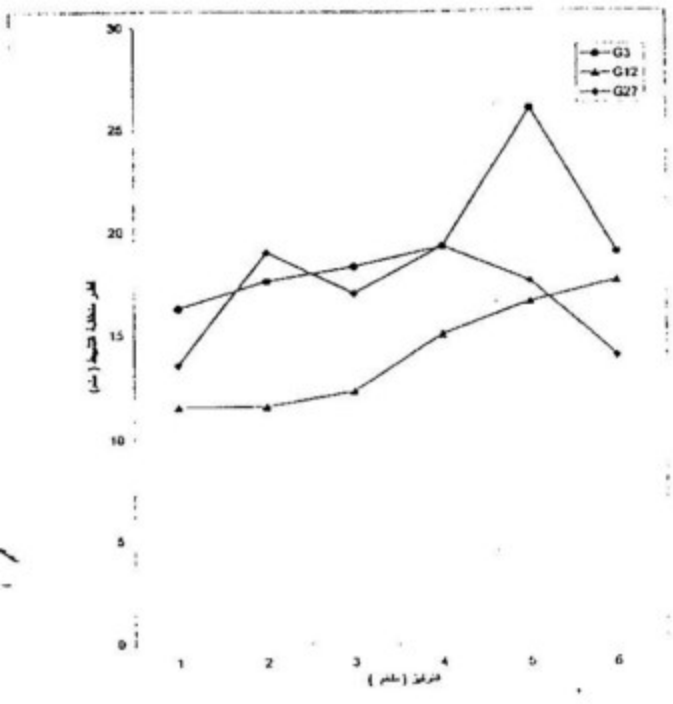
ويعمل المطفر على مناطق التضاعف التي تكون مفتوحة أمام تأثير NTG (21 , 24) وقد وجد إن تأثيره الأكبر يكون عندما تكون الأس الهيدروجيني حامض (5.5)(12) ، وهذا ما تم تطبيقه أثناء الدراسة ومن جهة ثانية يلاحظ أن المادة المطفرة هي التي تؤدي إلي زيادة تردد الطفرات *Mx* بزيادة التراكيز عندما تكون الخلايا قابلة للتطفير ويحقق الاستجابة للجرع المتزايدة (Dose-responsne) وهذا ما يلاحظ من الشكل ٥/أ الخاص بطفرات الستربتومايسين ،و ٥ /ب الخاص بطفرات الريفامبسين وهذا ما يتطلبه تحقيق أو كون الأنظمة الميكروبية صالحة للكشف عن المطفرات(2 , 22) . ويلاحظ أن تردد الطفرات لم يكن بدرجات عالية جدا وذلك لأنه تم التلاعب بوقت المعاملة بالمطفر حيث أن زيادة التركيز ولوقت طويل يمكن ان يؤدي إلى زيادة تردد الطفرات ولمقارنة قابلية الخلايا على التطفير للعزلات الثلاث فقد تم حساب Relative mutability (*Rmt*) كما موضح من الشكل 6/أ الذي يرتكز على مقاومة الستربتومايسين و 6/ب بالاعتماد على الطفرات المقاومة للريفامبسين . ويلاحظ ا ان العزلة G_3 هي ذات كفاءة عالية عند استعمال التراكيز الواطئة ، في حين تكون العزلة G12 افضل في تحديد التأثير المطفر للتراكيز المرتفعة نوعا ما (١٥)، أما في حالة استعمال صفة المقاومة للريفامبسين كدليل فيلاحظ ان العزلة G12 هي الأفضل كما هو في حالة المقاومة للستربتومايسين أما حساسية العزلات للمطفر فهي تقاس من حساب حساسية التطفير النسبية Relative mutational sensitivity (*Rms*) الموضحة في الشكل ٧(أ،ب) للطفرات المقاومة للستربتومايسين والمقاومة للريفامبسين على التوالي ، ويلاحظ من الشكل انه باستعمال أي من الواسمات الوراثية فان العزلة G12 هي الأكثر حساسية وان كانت G_3 تتفوق لحد ما عند استعمال مقاومة الستربتومايسين كمؤشر .

ومجمل النتائج تشير إلى إن العزلات يمكن أن تستعمل للكشف عن المطفرات التي تكون مختلفة التأثير على المواد الوراثية . وقد استعمل NTG بتركيز دون القاتل وذلك لان التأثير القاتل يؤدي إلي اختزال الإعداد بمستوى

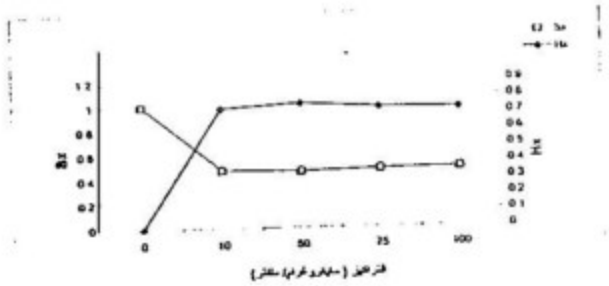
خمس دورات لوغارتيمية أثناء 30 ثانية عند البدء بعدد من الخلايا ١ x ١٠ ^٨ خلية /مللتر وذلك لان NTG يصيب أهدافا ممتدة على طول أشرطة DNA كما انه يؤدي إلي طفرات مضاعفة (24) وهذا لم يلاحظ في هذه الدراسة عند معاملة الخلايا لمدة قصيرة نوعا ما (15 دقيقة). ويمكن ان يتحسن أداء النظام فيما إذا تم تغير بعض الظروف المطبقة. وتحتاج العزلات الى دراسات أخرى لغرض وضع الخلفية الوراثية لها ، كما يمكن الدراسات المستفيضة ان تؤدي إلي تحديد أي من مجموعة المطفرات يمكن كشفها بهذه العزلات .

ويلاحظ من الدراسة ان العزلات تنتمي إلي أجناس مختلفة وهذا ملائما في دراسات التطفير إذ انه لا يعول على النتائج باستعمال أنواع من جنس واحد محدد (17) وذلك كان واضحا من ان العديد من المطفرات لم يمكن اكتشاف فعاليتها باستعمال سلالات أيمس , *Salmonella* ولكن أظهرت فعالية تطفيرية باستعمال *Bacillus* وذلك قد يعود إلى مشكلة النضوحية (27 ,26) مما أدى إلى العديد من الباحثين إلي التلاعب بأغلفة البكتريا المستعملة في تحديد المطفرات مثل تحوير *Salmonella* و *Escherichia coli* (27)، ولذلك فان النظام الحالي يتجاوز هذه المشكلة باعتبار ان العزلات هي موجبة لصبغة كرام وانها حساسة لنفوذ المواد ، فقد لوحظ ان أقطار مناطق التثبيط بالبلور البنفسجي تتراوح بين 13,6-26 ملم (شكل 1) والذي يعد مؤشرا جيد في هذه الخاصية مقارنة بالطفرات الجدارية في *Salmonella* و *E.coli* الذي يصل قطر منطقة التثبيط فيها إلي 12 14-- ملم (27)

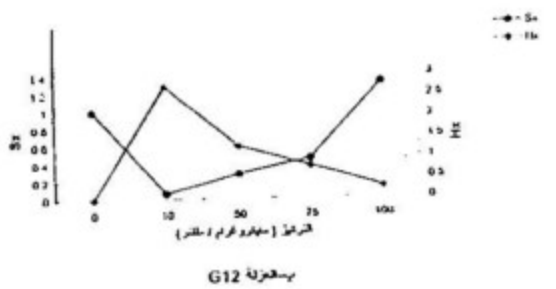
ومن جهة أخرى يلاحظ ان معظم أنظمة الكشف عن المطفرات تعتمد على الطفرات الراجعة وهذه وان كانت ملائمة جدا في تحديد صنف المطفر الا ان استعمال حث الطفرات المباشر Forward mutations(27) وهي التي استعملت في هذه الدراسة فهي توفر فرصة اكبر واوسع لتحديد أنواع مختلفة من المطفرات أو المواد التي لا تتوفر دراسات مسبقة عنها . كما ان الطفرات الراجعة المستعملة في الكشف عن المطفرات تؤدي الى عدم وضوح الرؤيا بالنسبة للمواد الموجودة في المواد الغذائية ، اذ ان السلالات هي طفرات عوز غذائي Auxotroph(2 , 17).



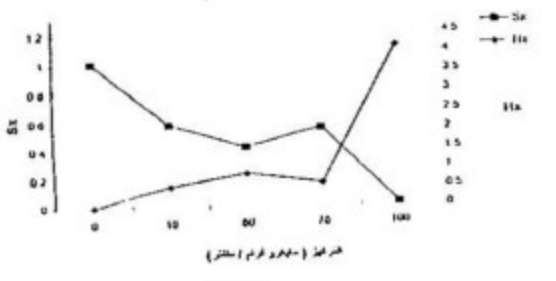
شكل ١ : تأثير التراكيز المتدرجة من صبغة البلور البنفسجي على العزلات الثلاث



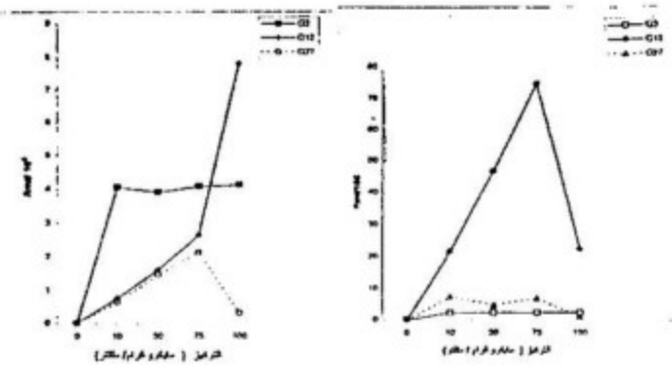
أ-العزلة G3



ب-العزلة G12



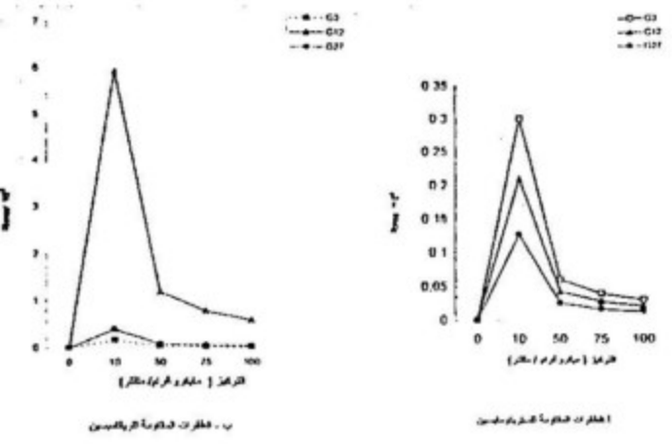
ج-العزلة G27



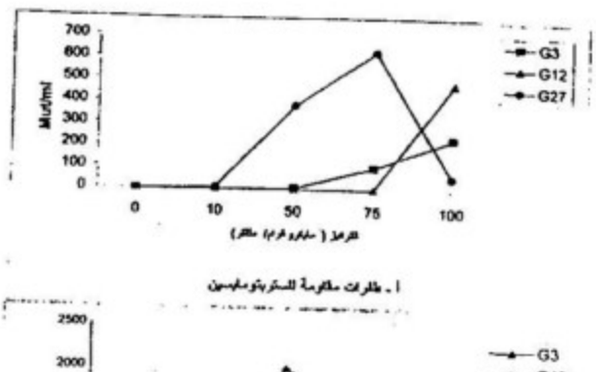
أ - طافرات مقاومة للستربتومايسين

ب - طافرات مقاومة للريفامبيسين

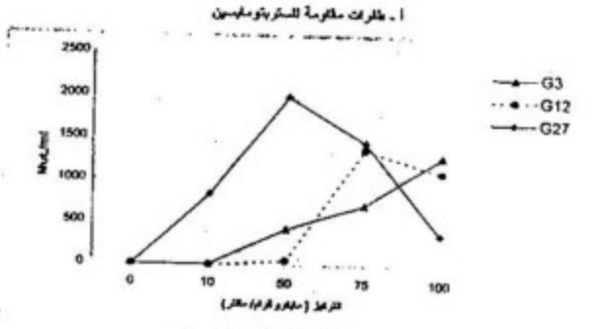
جـ - طافرات مقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين

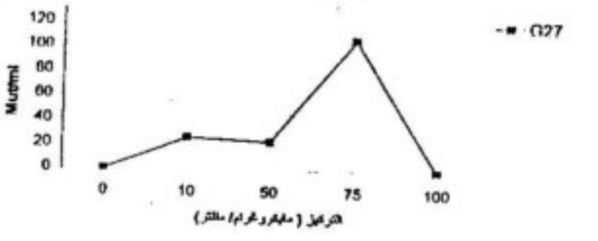


أ. الطافرات المقاومة للستربتومايسين



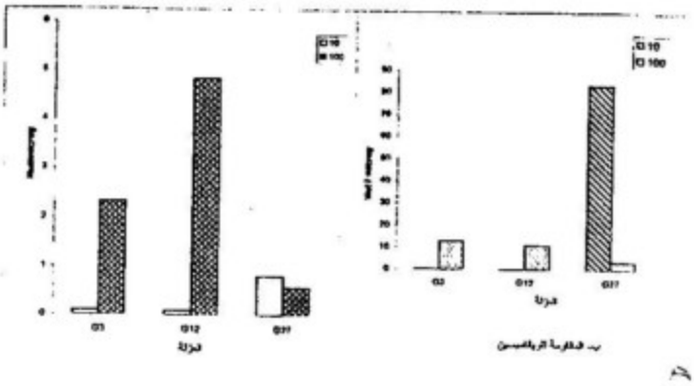
ب - الطافرات المقاومة للريفامبيسين





شكل ٦ : [illegible] (Relative mutability)

أ. الطافرات المقاومة للستربتومايسين



ب - الطافرات المقاومة للريفامبيسين

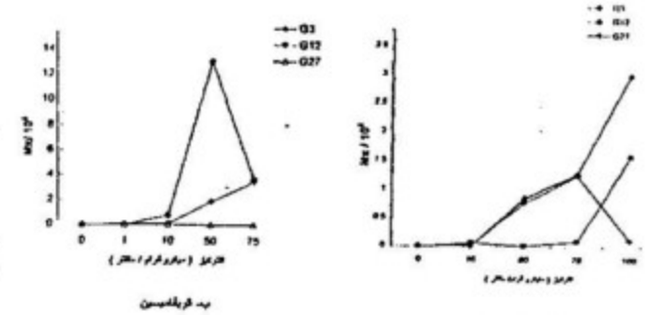
أ. المقاومة للستربتومايسين

ب- المقاومة للريفامبيسين

شكل ٤ : [illegible]

أ. الستربتومايسين

ب- الريفامبيسين



شكل ٥ : تأثير التراكيز [illegible] من NTG على [illegible] أ. الطافرات المقاومة للستربتومايسين ب - الطافرات [illegible]

References

1. Simmon , V.F. 1979. *In vitro* mutagenicity assays of chemical carcinogenes and related compounds with *Salmonella typhimurium*. J. Natl Cancer Inst. 62: 893 - 899.
2.Kier , L.D ., Auletta , A.E , Halle , E.S , Brown , M. M. , Simmon , V.F. , Dunkel , V. , Mortelmans , K. ,Prival , M . , and Rao , T. K 1986 . The *Salmonells typhimurium* /mammalian microsomal assay : A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene - Tox Program . Mut . Res . 168: 6 9-240 .
3.DeMarini , D .M . , Pham , H .N . , Kat3 , A . J . and Brockman , H.E .1984 . Relation ships between structures and mutagenic potencies of heterocyclic nitrogen mustards (ICR compounds) in *Salmonella typhimurium* Mut . Res. 136: 185_199.
4. Felkner , I.C.(Ed.).1981 .Microbial Tester : Probing Carcinogensis .Marcel Dekker , Inc . :New York ,Basle .
5.Watanabe , T.and Hirayama , T.2001 . Genotoxicity of soil .J .Health Sci.47:433-438.
6.Rao, K.S., Yong,M.D.,Shaw , M.S. and Parton , J.W.2004.Mutagenicity test applied for regulation of developing products . Curr. Separations . 20:141-144.
7.Swenon ,D.H. and Kadlubar ,F.F 1981. Properties of Chemical Carcinogens in Relation to their Mechanisms of Action . *In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis " Ed. I .C Felkner . Marcel Dekker , Inc.: New York, Basle.
8.Ward ,J.B.,Rinkus,S.J. and Legator ,M.S.1981.Strategies for Overcoming the Deficiencies of Microbial Activation systems for Detecting Chemical Mutagens .*In* "Microbial Testers: Probing Carcinognesis." Ed. I. C. Felkner ,Marcel Dekker ,Inc.: New York , Basle.
9.Nath,J.Krishra , G. 1998 .Safety screening of drugs in cancer therapy.Acta Haematologica.99:138-147.
10.Szybalski, w.1952.Microbial selection: I-Gradient plate technique for study of bacterial resistance. Science 116:46-48.
11. Barry,A.L. 1986.Procedures for Testing Agents in Agar Media ".Ed.V. Lorran.2nd Edition. Williams &Wilkins: Baltimore, London.
12.Miller,J.H.1972.Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory : New York.
13. Streips, U.N ,Laumbach, A.D. and Yasbin,R.E.1981.Bacterial Mutation Monitors for Active Metabolites of Chemical Carcinogens: *B.subtilis* Assays for Mutation and DNA Repair .*In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis "Ed. I. C. Felkner , Marcel Dekker. Inc.: New York ,Basle.
14.Hayes ,W.1968 .the Genetics of Bacteria and their Viruses . Blackwell Scientific Publications. Oxford , England.
15.Eckardt ,F.and Haynes ,R.H 1981.Quantitative Measures of Induced Mutagenesis .In" Short-Term Tests for Chemical Carcinogens" Eds .H. F. Stich& R. H. C. San .Springer-Verlag : New York , Berlin.
16. Coleman, D. C, Pomeroy, H., Estridge , J.K. Keane , C. T., Cafferky , M . and Fostes , T. 1985 . Susceptibility to antimicrobial agents and analysis of plasmids in gentamicin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Dublin hospitals . J.Med. Microbiol .20 : 157 – 167 .
17 . Felkner , I. C. , Laumbach , A.D. amd Harter, M.L. 1981 . Development of a B.subtilis system to screen Carcinogenos Mutagens :DNA damaging and Mutation Assays . In Microbial testers : Probing carcinogenesis . Ed. I. Felkner . Marcel Dekker . Inc. : New York ,Basle .

18.Monteville , T.J, 1987 . Food Microbiology . Vol. I. CRC Press Inc. : Boca Raton , Florida .
19 –Czys , A., Jasiseck , J. Bogdan ,A., Szpikewska , H.and Wegrzyn,G.2000. Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollutoin of marine environments .Appl .Environ . Microbiol .66:599-605.
20- Harrigan , W.F. and McCance , M.F. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology > Academic Press: London .
21- Nest mann , E.R.1975 .Mutagenesis by nitrosoguanidine .ethyl methanesulfonate ,an mutator gene mutH in continuous cultures of *Escherichia coli* . Mut Res .28 :323-330.
22-WHO .1985 .Guide to Short – Term Tests for Detecting Mutagenic and Carcinoy genic Chemicals . ,environmental Health Criteria # 51
23- Ruiz- Vazques , R., Cerda-Olmedo, E. 1980 . An *Escherichia coli* mutant refractory to nitrosoguanidine mutagenesis. Mol. Gen. Genet. 178 : 625-631 .
24- Jimenez ,A., and Cerda – Olmedo .E.1975 . Mutation and DNA replication in Escherichia coli treated with different concentration of N-methyl Nnitro-N-nitrosoguanidine. Mut Res. 1975.28:337-345.
25-Kilby ,B.J 1981. Ultraviolet Mutagenesis :Acompari son of Mechanisms in *E.coli* and yeast Saccharomyces cerevisiae .*In* " Microbial Testers:probing carcinognesis Ed.I.C . Felkner .Marcel Dekker Inc.:New York ,Basel.
26-Prescott ,L.M , Harley, J. P. and Klein ,D.A .1999. Microbiology .4th Edition .McGraw Hill . Boston , London .

27 –Matney T. S .1981 Mutagenic Assays in Gram _Negative Bacteria for the Detection of Potential Cacinogens : Activation by Mammalian Microsoal Factors . *In* " Microbial Testers :Probing Carcinogenesis ." Ed. I.C . Felkner. Marcel Dekker Inc. : New York , Basle .

Developing of Bacterial Mutagenic Assay System for Detection of

Environmental and Food Mutagens
I-Mutagenesis with Standard Mutagen , Nitrosoguanidine

Gaith,L. Al- Azawi **Zahra M. Al -Khafaji**
Warkaa Y.Al-Mashadani **Atheer A-M.Al-Hassan**

Abstract

. Three soil isolates were selected to develope mutagenicity test system. They were G3 belongs to *Bacillus* spp ; G12 belongs to *Arthrobacter* ; G27 belongs to *Brevibacterium* . They were sensitive to streptomycin and rifampicin . The isolates were tested for their sensitivity to crystal violet , G3 was the most sensitive isolate .
Mutagen N- methyl –N – nitro – N nitrosoganidine (NTG) used to mutagenize these isolates and using streptomycin and rifampicin resistance as a chromosomal markers . NTG treatment caused reduction in viable count of isolates at different levels . The treatment also led to induction of streptomycin and rifampicin resistant mutants, in one case the treatment led to induction of double mutant (i.e. , resistant to streptomycin and rifampicin at the same time) in G27 isolate only.
Dose- response of mutation frequency was observed as an increasing in mutant frequency with increasing mutagen concentration Comparison of relative mutability (*Rmt*) of isolates was carried out and G12 exhibited the highest *Rmt* and this extended when calculating the relative mutational sensitivity (*Rms*).