

## تطوير نظام بكتري لتحديد المطفرات في البيئة والأغذية ثانياً : استعمال عوامل الحشر: الاكريدن البرتقالي

زهرة محمود الخفاجي\* غيث لطفي العزاوي\*\*

تاريخ قبول النشر ٦/٤/٢٠٠٥

### الخلاصة :

استعمل المطفر الاكريدن البرتقالي وهو من عوامل الحشر التطهيرية لدراسة استجابة عزلات انتخبت بناء على مواصفات خاصة بحيث كانت ذات استجابة ايجابية مع مطفر قياسي (NTG) (Nitrosoguanidin). والنظام مكون من ثلاث عزلات  $G_{27}, G_{12}, G_3$ . استعمل الاكريدن البرتقالي بتراكيز متدرجة وتحت ظروف محددة مشابهة لظروف التطهير الخاصة بالـ NTG للمقارنة. أدت المعاملة الى خفض الأعداد المتبقية حية بعد المعاملة بشكل عام . أما التأثير المطفر الذي تم تبيانته بقياس عدة مؤشرات منها عدد الطفرات المستحثة /ملتر وحاصل الطفرات وتردد الطفرات ومقارنة ذلك بمعاملة NTG.

أشارت النتائج الى أن المركب أدى الى حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين ولكن بشكل اضعف من NTG والذي اتضح من نتائج كفاءة المطفر (طفرة / لكل مايكروغرام من المطفر) وقد يعود ذلك الى حواجز النضوحية نظرا لكبر جزيئة الاكريدن البرتقالي وارتفاع وزنه الجزيئي وقد أشارت النتائج الى ان العزلة  $G_{12}$  هي الأكثر تعرضا للتطهير (Relative mutability) سواءا بالاكريدن البرتقالي أو NTG وكذلك كانت العزلة الأكثر حساسية ماعدا تسجيل حساسية اكبر للعزلة  $G_{27}$  في حالة حث الطفرات المقاومة للريفامبسين .

### المقدمة :

الراجعة Back mutation ولكل من الاتجاهين مساوئه وفوائده (١١،٦) وفي كلا الحالتين تستعمل الأحياء المجهرية وعلى وجه الخصوص البكتريا. ففي مجال الطفرات الراجعة تستعمل سلالات ايمس *Salmonlla typhimurium* ، او سلالات خاصة من *Escherichia coli* (١١،٦). بالإضافة الى استعمال البكتريا الموجبة لصيغة كرام *Bacillus subtits* (١٢). وتستعمل أنظمة الكشف عن المطفرات في العديد من المجالات منها الكشف عن المطفرات في التربة (١٣) او لتحديد صلاحية الأدوية الخاصة بعلاج السرطان او أي أدوية أو منتجات تطرح حديثا للأسواق (١٥،١٤) ونظرا لعدم توفر نظام قصير الأمد Short-term test أجريت المحاولة لإيجاد نظام ضمن مواصفات خاصة (١٦)، ويتناول هذا الجزء من سلسلة الدراسات

تعد عملية التطهير أحد مؤشرات التسرطن (١) ولذلك نشطت البحوث في استنباط العديد من الأنظمة البسيطة لتحديد المطفرات وخطورتها على الإنسان (٢) حيث وجد ان هناك علاقة وتوافق نوعي بين المواد المطفرة والمسرطنة (٤،٣). وقد أشارت الدراسات إن ٦٥-٨٥ % من المواد المسرطنة سواء العضوية او غيرها هي مواد مطفرة (٦،٥). وقد استغلت الأنظمة الميكروبية في هذا المجال بشكل كبير لحساسيتها وسرعة نموها للحصول على النتائج في وقت قصير ، وقد اصبح هذا متبولا كخطوة أولى في تحديد القابلية تسرطنية لتعداد (١٠،٩،٨،٧). ويعتمد فحص تطهير على حث الطفرات مُباشرة Forward mutation و الطفرات

\* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا/ جامعة بغداد.

\*\* تلميذ علي معهد هندسة جزيئية وتكنولوجيا الحيوية للدراسات العليا/جامعة بغداد.

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

### اختبارات التطهير:-

تم تحضير مزروع لوغاريمي للجزلات التي تم انتخابها في وسط المرق المغذي الى كثافة ضوئية OD<sub>٦٠٠</sub> بحدود ٠,١٥-٠,٢٥ والذي تتراوح اعداد الخلايا الحية

١-٤ x ١٠<sup>٧</sup> وحدة تكوين المستعمرات / CFU / ملتر. فصلت الخلايا عن الوسط بالطرد المركزي وغسلت الخلايا بمحلول داري الفوسفات باس هيدروجيني ٥,٥ ثم علقت بنفس الحجم من داري الفوسفات وقسمت إلى عدة أقسام بحجم ٥ ملتر ، وحدد العدد الحي للخلايا في وقت الصفر ، ثم عولمت النماذج بتراكيز متدرجة من AO (١٠,٥، ٥٠، ٧٥، ١٠٠) مايكروغرام/ملتر لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ٣٧ م ، بعد ذلك فصلت الخلايا من المحلول وغسلت الخلايا بمحلول داري الفوسفات ثم علقت وحدد العدد الحي بعد المعاملة مباشرة ، وكذلك زرعت النماذج على أوساط حاوية على الستريبسومايسين والريفاميسين لتحديد الطفرات المقاومة . ثم حصنت النماذج بدرجة م لليوم الثاني لغرض التعبير الظاهري Phenotypic expression (١٣) وفي اليوم التالي تم تحديد عدد الخلايا الحية وكذلك تم تحديد عدد الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية الستريبسومايسين ، الريفاميسين ، الستريبسومايسين + الريفاميسين (١٢) ( ١٤،

### الحسابات:-

أجريت الحسابات وفق المراجع الخاصة (١٥) ١. تحديد الجزء الحي المتبقي (Sx)

Survival fraction

$$Sx = Ns/No$$

x تركيز المطفر

Ns عدد الخلايا المتبقية بعد المعاملة مباشرة

No عدد الخلايا الحية في نموذج السيطرة (بدون معاملة).

٢. حددت Lethal hits (Hx) وفق المعادلة:

$$Sx = \exp [- Hx]$$

٢. تردد الطفرات (Mutant ) Mx

(frequency)

$$Mx = N_m x / No$$

N<sub>m</sub>x عدد الطفرات المستحثة عند التركيز x

٤. حاصل الطفرات (Mutant yield) (Yx)

استعمال عوامل الحشر Intercalating agents المتمثلة بصيغة الاكريدن البرتقالي Acridine orange (AO) ومقارنة فعاليته التطهيرية مع المطفر الموثوق Nitrosoguanidine في العزلات G<sub>27</sub>, G<sub>12</sub>, G<sub>3</sub> التي اختبرت لتمثل مكونات نظام بكتيري قصير الأمد لتحديد الطفرات في الاغذية او غيرها من النماذج (١٦).

### المواد وطرائق العمل الايوساط الغذائية:

- وسط اكار اساس الدم Blood agar base من شركة England/Mast
- وسط المرق المغذي Nutrient broth من شركة Germany/Merck
- محلول التخفيف ، استعمل ٠,١% من التريتون (Oxoid) في الماء المقطر.
- محلول داري الفوسفات: حضر بتركيز ٠,٠٥ عياري وعدل الاس الهيدروجيني ٥,٥ باستعمال محلول عياري من حامض الهيدروكلوريك (HCl).

### المضادات الحيوية:

- الستريبسومايسين: استعمل بشكل كبريتات الستريبسومايسين Streptomycin sulphate من شركة India/Ajanta.
- الريفاميسين Rifampicin: من معمل الادوية في سامراء (SDI) / العراق.
- صبغة البلور البنفسجي Crystal violet: من شركة BHD/انكلترا.
- المطفر: استعمل Acridine Orange شركة BDH/انكلترا

### العزلات البكتيرية:

عزل عدد من البكتريا من نماذج تربة من مناطق بعيدة عن مصادر التلوث والحاضرة ، تم إجراء التخفيف اللازمة وزراعتها على وسط اكار اساس الدم وحصنت بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة للحصول على مستعمرات معزولة. اختيار تركيز المضاد الحيوي : تم باستعمال طريقة التدرج بالتركيز في الاطباق (١٠). اختبار الحساسية لصبغة البلور البنفسجي: استعملت تراكيز متدرجة من الصبغة ٧,٦,٥,٤,٣,٢ مللغرام /مللتر و حددت حساسية العزلات باستعمال طريقة الاقراص الورقية (١١).

للمستربتومييسين حيث كان التركيز ١٠ مايكروغرام أكثر كفاءة من NTG وقد يعزى ذلك الى قلة نضوحية الاغشية او ان الخلايا هي ليست في حالة نمو حيث يكون هناك فتح لاشطرة DNA وحث الطفرات في دورات التضاعف المتتالية التي يجب ان تكون بوجود AO لحدث الطفرات فيها (١٢،٦).

اما كفاءة AO في حث الطفرات والتي تقاس بحساب اقصى ما يمكن من الطفرات المستحثة عند استعمال اوطاً التراكيز (١٠) مايكروغرام/ملتر) فموضحة في (الشكل ٣). ويلاحظ ان AO مساويا او يفوق NTG في حث اقصى ما يمكن من الطفرات (عند التراكيز الواطئة)، مع العلم ان AO له وزن جزئي اعلى مما للـ NTG كما ذكر اعلاه والذي يعاق بواسطة الحدود الخارجية للبكتريا السالبة لصبغة كرام كما في بكتريا *Salmonella typhimurium* والذي اضطر العاملون الى اشتقاق الطفرة *rfa* لتسهيل مهمة تحديد الطفرات (١٢،٦)، والنظام المستعمل في هذه الدراسة هي بكتريا موجبة لصبغة كرام (١٦) مما يخفف من عرقلة النضوحية (٢٥).

ومن المعروف ان اعتبار المادة مطفرة لابد من ان تحقق قاعدة الاستجابة بزيادة التركيز (Dose-response) (٢٦،٦) ولذلك حسب ترد الطفرات (Mx) في النماذج المعاملة كما موضح في (الشكل ٤) للطفرات المقاومة للمستربتومييسين والطفرات المقاومة للريفاميسين وباستعمال NTG للمقارنة. ويلاحظ من الشكل ان العزلات المختلفة كانت لها استجابات مختلفة، فالعزلة G<sub>3</sub> لم يؤثر عليها AO بشكل كبير بالتراكيز المتزايدة سواء بالنسبة للطفرات المقاومة للمستربتومييسين او الريفاميسين مقارنة بالمطفر NTG الذي ادى الى زيادة بالنسبة للمستربتومييسين او الريفاميسين. اما العزلة G<sub>12</sub> فقد استجابت بزيادة طفرات مقاومة للمستربتومييسين ولكن بالتراكيز العالية فقط. وهذا يؤكد حقيقة انه لا يجب الركون الى استعمال نوع واحد من الاحياء لتحديد القابلية التطفيرية لمادة ما (١٢). فمن الدراسات التي اثبتت ان لمركب AO قابلية تطفيرية الدراسة التي اجريت على الطحلب احادي الخلية *Euglena gracilis* خاصة في بلاستيدياتها الخضراء (٢٧)، فمن المثبت ان AO من عوامل الحشر التي تدخل بين القواعد النتروجينية في DNA مسببة لطفرات اما باضافة او حذف زوج من القواعد اثناء عملية التخليق (٢٨). ونتائج تردد الطفرات تتسحب على حساب كفاءة المطفر

$$Y_x = N_{mx} / N_o$$

٥. أعلى حاصل للطفرات عند تركيز معين أو

عند اقل تركيز مستعمل  $Y_{max}$

٦. قابلية الخلايا للتطفير النسبية

(Rmt) Relative mutability

$$Rmt = Y_{max} / H_x$$

٧. حساسية التطفير النسبية (Rms) Relative

mutational sensitivity

$$Rms = Y_{max} / x$$

٨. كفاءة المطفر Mutagen efficiency

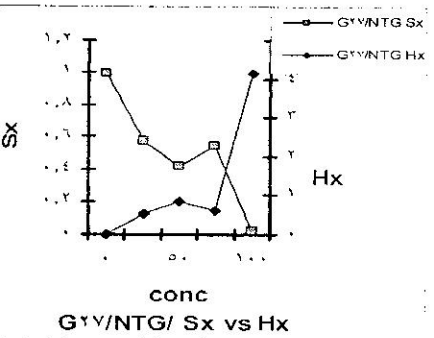
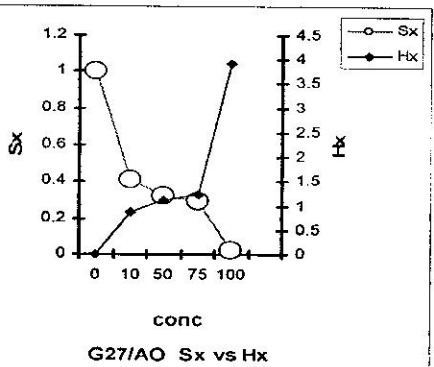
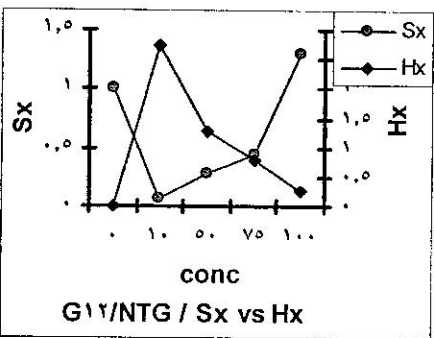
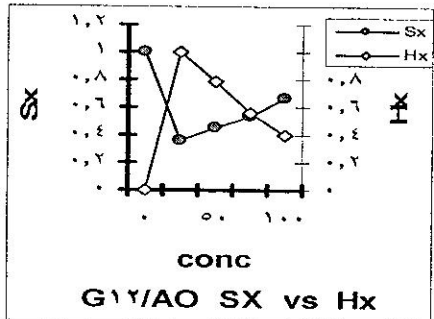
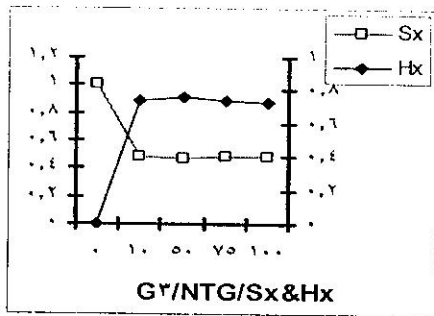
Mut . Eff. = No. of mutant/ml /  $\mu$ g mutagen

## النتائج والمناقشة

العزلات المستعملة كانت حساسة لصبغة البلور البنفسجي Crystal violet ذو الوزن الجزيئي ٤٠٧،٩٩٦ (١٦) وقد عوملت بالاكريدين البرتقالي ذو الوزن الجزيئي ٤٣٨،١ ، والمركب صيغة قاعدية لها قابلية تطفيرية للاحياء والتراكيز تحت القاتلة تؤدي الى طرد البلازميدات من الخلايا البكتيرية (٢٣).

يوضح (الشكل ١) الجزء المتبقي من الخلايا الحية بعد المعاملة مباشرة بتراكيز متدرجة من AO لمدة ١٥ دقيقة للعزلات التي تمثل النظام ، مقارنة بنتائج المقارنة بالمطفر القياسي NTG . ويلاحظ بالنسبة للعزلة G<sub>3</sub> تكاد تكون النتائج متقاربة بالنسبة للـ AO والمطفر NTG . اما بالنسبة للعزلة G<sub>12</sub> فالجزء المتبقي Sx والذي يشير الى زيادة قتل الخلايا بزيادة التركيز والذي يصاحبه زيادة في اهداف القتل في الخلية (Lethal (Hx) (hits). في حين كانت ظاهرة القتل للعزلة G<sub>27</sub> واضحة حيث ازدادت نسبة القتل ووصل Sx عند استعمال التركيز ١٠٠ مايكروغرام/ملتر الى ٠،٠٢ فقط من اصل عدد الخلايا قبل البدء بالمعاملة والذي يشابه ما حدثه استعمال NTG (المتبقي ٠،٠١٦). وتعد عملية قياس قتل الخلايا بالمطفرات هي اول خطوة لابد من اجرائها ثم يتم بعدها تحديد التأثير المطفر (٢٢).

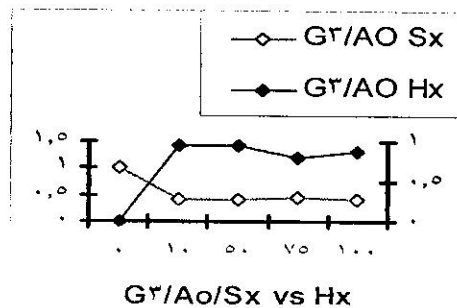
ولدراسة التأثير المطفر في حث الطفرات فقد تم تقدير عدد الطفرات الناتجة من تأثير المعاملة بتراكيز متدرجة من AO ومقارنة ذلك بما يحدثه المطفر القياسي NTG واعتماد المقاومة للمستربتومييسين والريفاميسين واسمات وراثية كروموسومية ثابتة (٢٤) فهي موضحة في (الشكل ٢) بالنسبة للطفرات المقاومة للمستربتومييسين والطفرات المقاومة للريفاميسين ويلاحظ تفوق مطفر NTG على AO الا في حث العزلة G<sub>12</sub> وطفراتها المقاومة



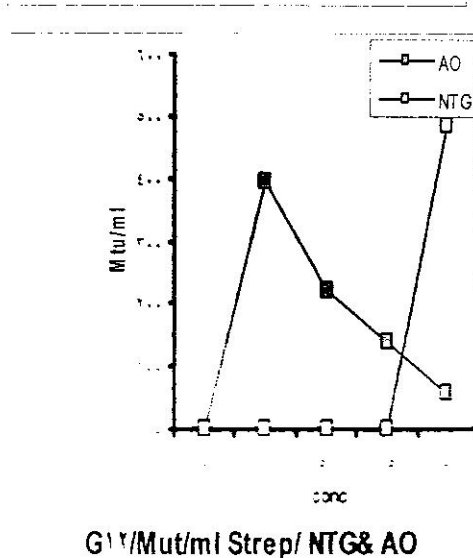
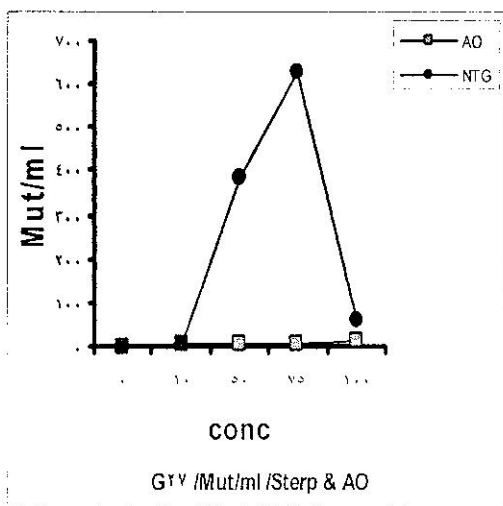
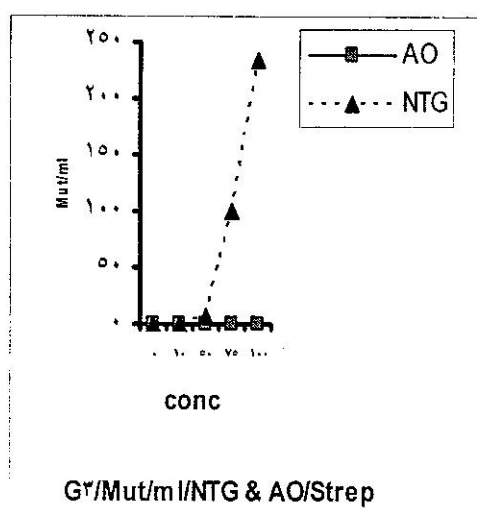
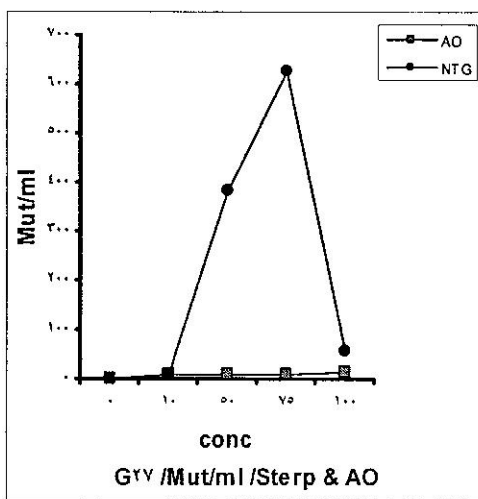
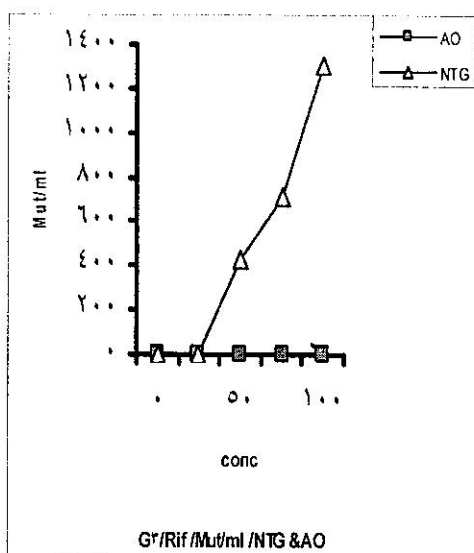
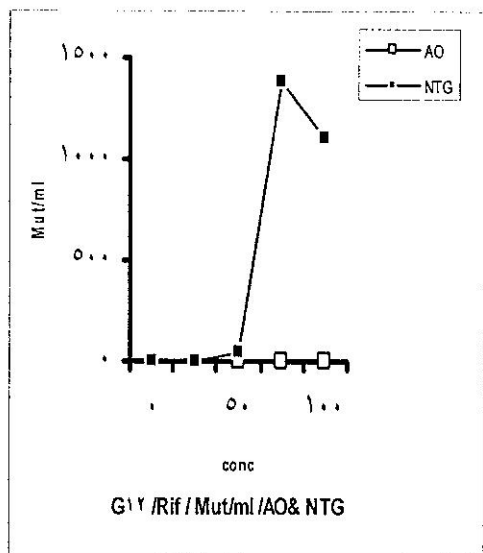
والموضحة في (الشكل ٥) لطفرات مقاومة الستربتومايسين والطفرات المقاومة للريفاميسين ، حيث بقي NTG متفوقا في هذا المجال .

اما قابلية العزلات للتطفر Mutability تجاه AO والتي تقاس بحساب Relative mutability فهو موضح في (الشكل ٦) الخاص بالمطفر AO ومقارنة ذلك بالمطفر القياسي NTG ومع ان استجابة العزلات لمركب AO قليل الا انه يبدو ان العزلة G12 هي الاكثر استجابة في حالة تسجيل طفرات المقاومة للستربتومايسين والى حد ما بالنسبة للطفرات المقاومة للريفاميسين وان كانت العزلة G27 قد تفوقت في الصفة الاخيرة و Rmt بالنسبة للمركب AO هي اقل بكثير مما سجل بالنسبة لمركب NTG والتي اظهرت فيه العزلة G12 كفاءة اكثر .

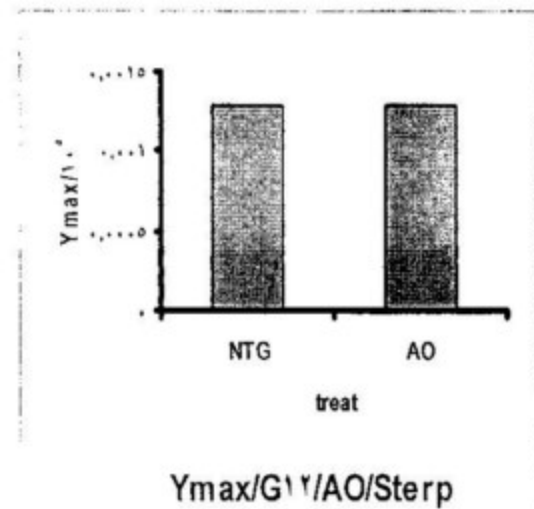
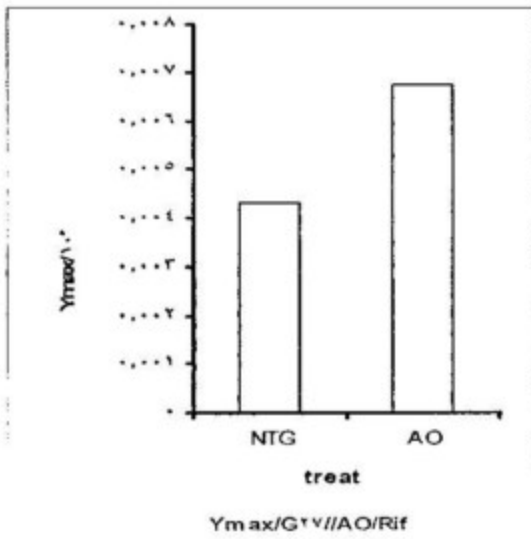
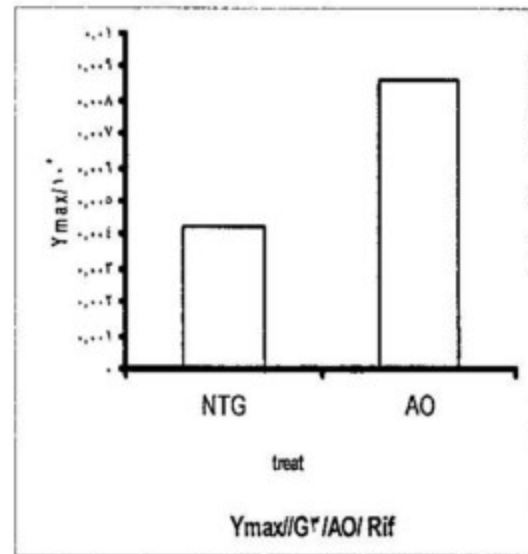
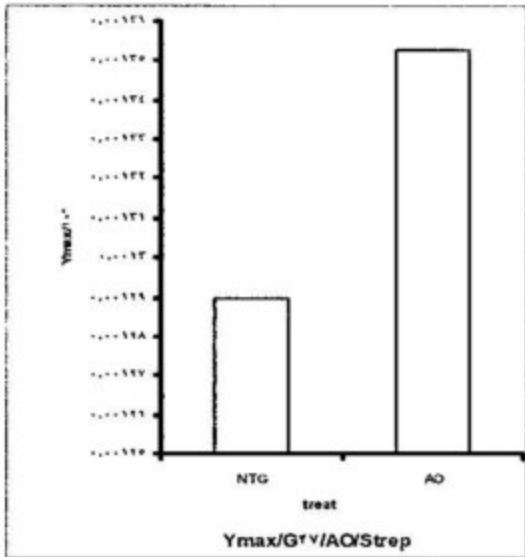
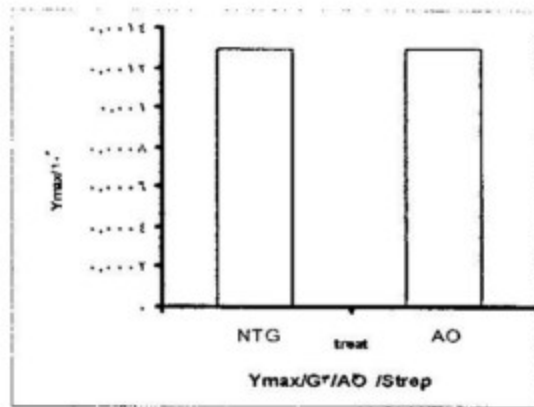
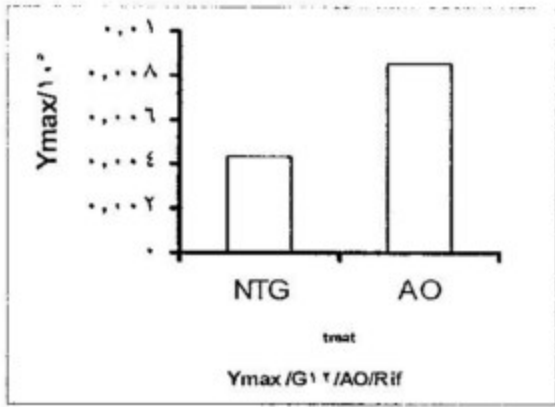
المؤشر الاخير الذي تم حسابه هو حساسية العزلات التطفيرية النسبية Relative mutational sensitivity لمقارنة عزلات النظام وهي موضحة في (الشكل ٧) .ومرة اخرى تسجل العزلة G12 حساسية اكبر سواء بالنسبة لمركب AO و NTG ويلاحظ ان حساسية العزلات للمطفر الاول هي منخفضة عما هو مسجل بالنسبة للمطفر القياسي NTG . ولعل اهم الاسباب في هذا المجال هو مشكلة النضوحية اذ ان AO ذات وزن جزئي كبير كما ذكر انفسا (٢٩،٦) ، وربما احتاجت العزلات الى معاملات اضافية لغرض زيادة حساسيتها لمركب AO او أي مركبات اخرى ذات اوزان جزئية عالية مختلفة التركيب الكيماوي (٧) .



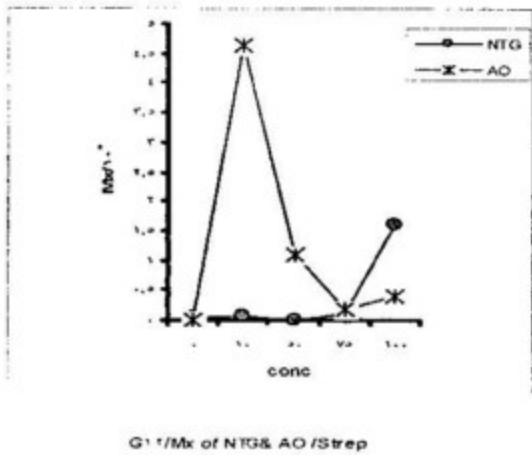
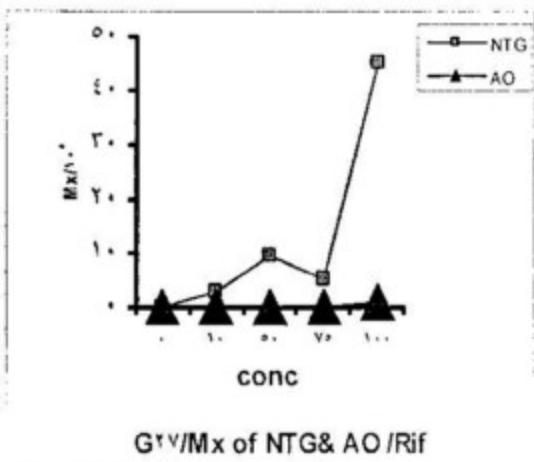
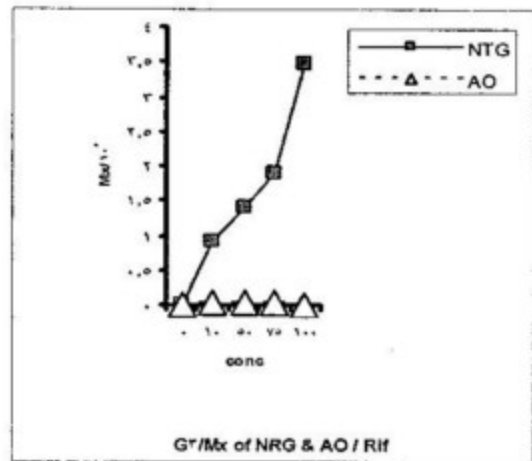
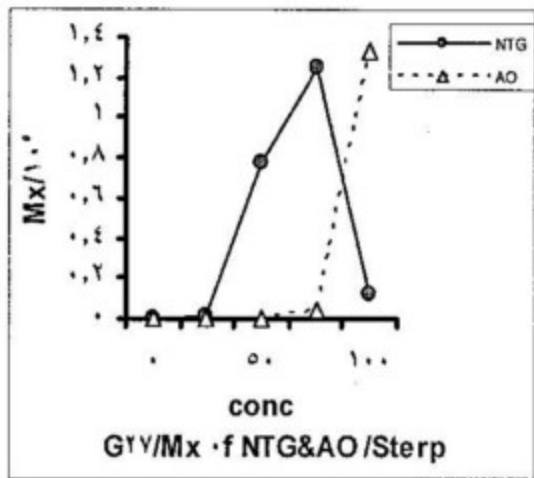
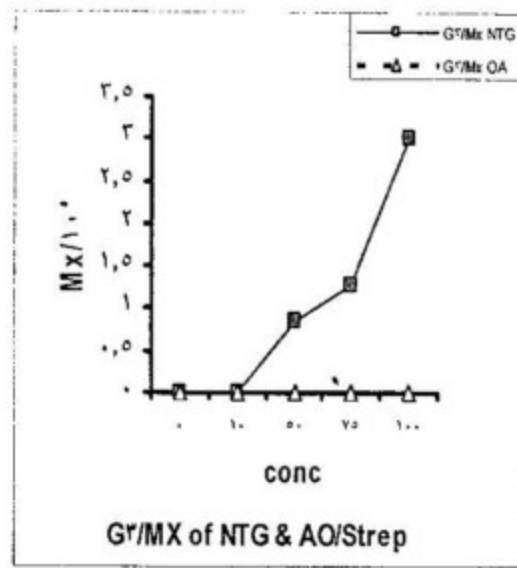
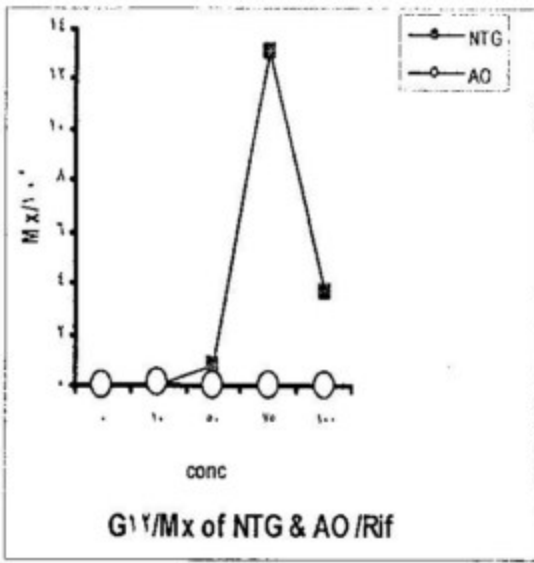
شكل ١ : الجزء الحي المتبقي Sx من الخلايا وما يقابله من Hx عند معاملة الخلايا بالمطفرات



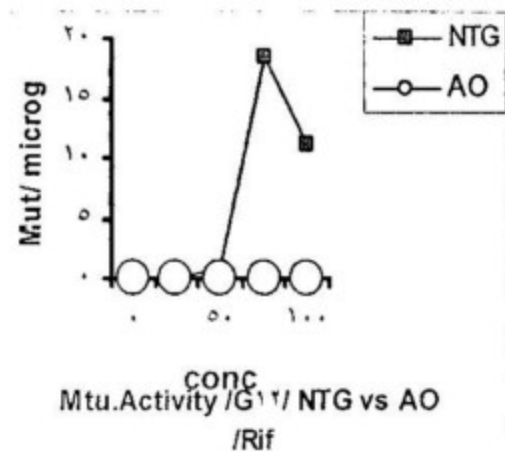
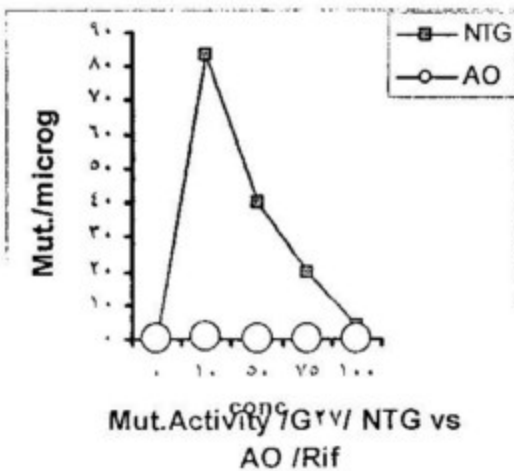
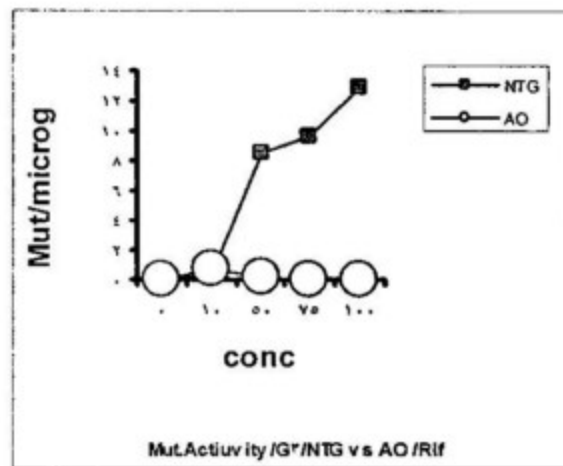
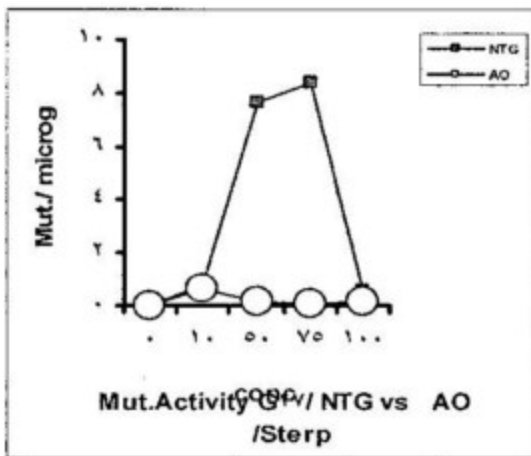
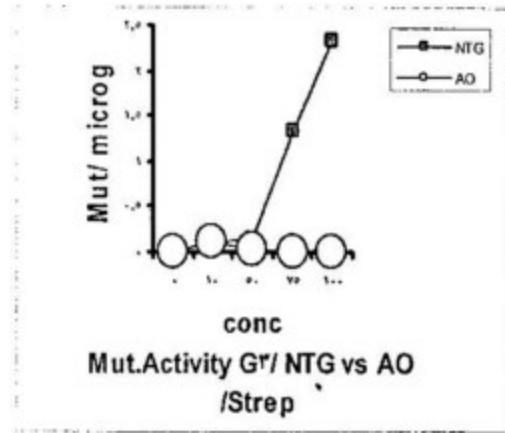
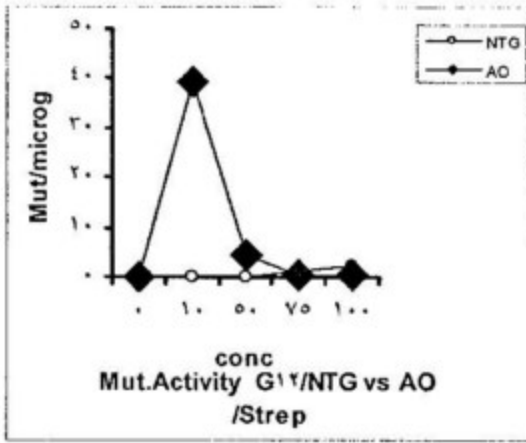
شكل ٣ : تأثير AO على عدد الطفرات المستحثة / ملتر وبتراكيز متدرجة مقارنة الـ NTG



شكل ٣ : أقصى ما يمكن من الطفرات المستحثة عند اوطأ تركيز مستعمل / ١٠ مايكروغرام من المطفر AO و NTG

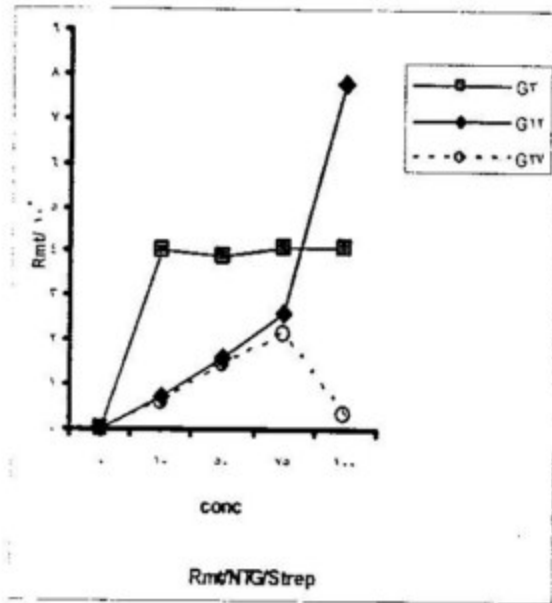
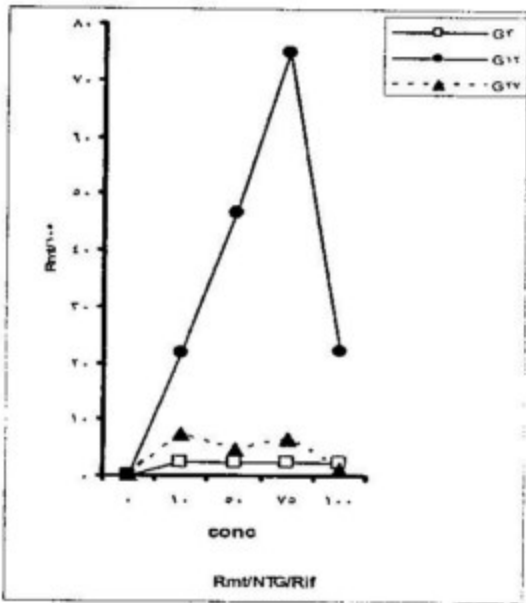
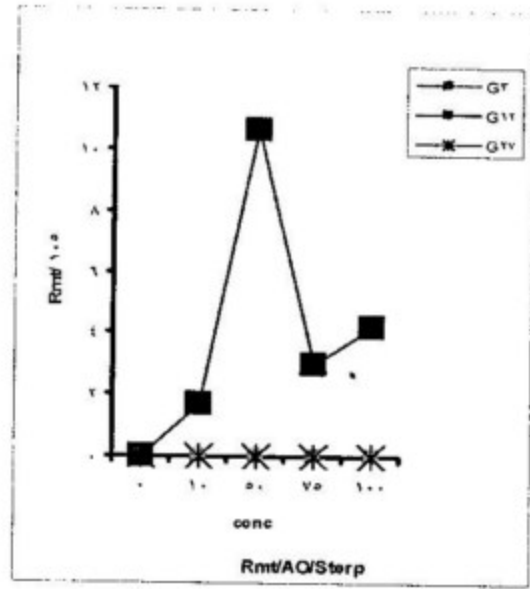
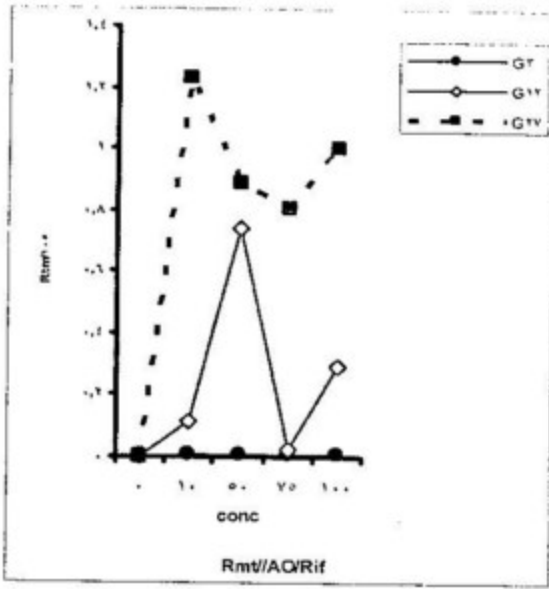


شكل ٤ : تردد الطفرات الناتجة من تأثير AO مقارنة بالـ NTG

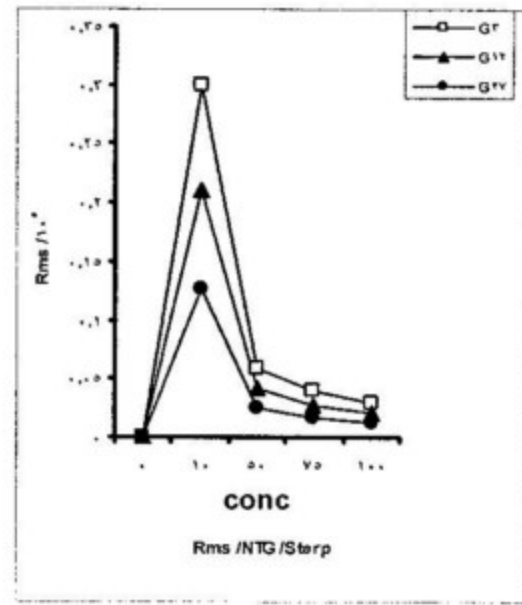
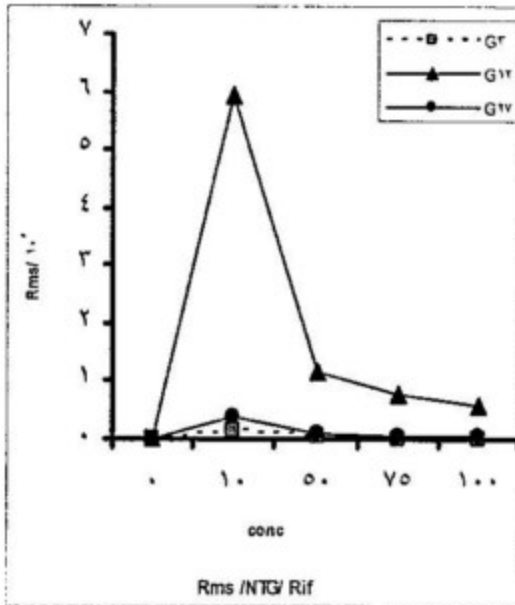
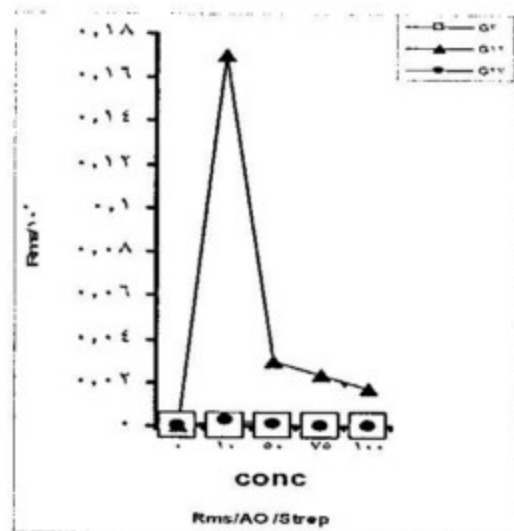
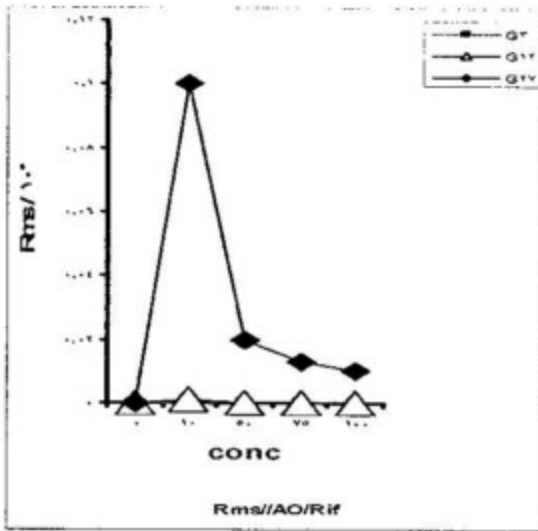


شكل ٥ : كفاءة المطفرات ( طفرة / ميكروغرام ) لحث الطفرات في العزلات الثلاث





شكر (٦) تقنية عزلات للتطهير Relative mtability بالمطفر AO مقارنة بالمطفر NTG



شكل ٧ : حساسية العزلات النسبية للتطهير Relative mutability للمفرات AO و NTG

## References

- 1- Gericke, D. 1983. Microbiological term tests for the evaluation of mutagenic potential of chemical substances. *Naturwissenschaften*. 70: 173-179.
- 2- Ward, J.B., Rinkus, S.J. & Legator, M.S. 1981. Strategies for Overcoming the Deficiencies of Microbial Activation System for Detecting Chemical Mutagens. In: "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis." Ed. I.C. Felkner. Marcel Dekker, Inc.: New York, Basel
- 3- Song, P., Ou, C.N., Tapley, J. 1981. Photoactivation of Furocoumanyl Carcinogens/Mutagens & their Interactions with Nucleic Acids. In: "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C. Felkner. Marcel Dekker, New York, Basel.
- 4- DeMarini, D.M., Pham, H.N., Katz, A.J. & Brockman, H.E. 1984. Relationships between Structures & mutagenic Potencies of heterocyclic nitrogen mustards (ICR compounds) in *Salmonella typhimurium*. *Mut. Res.* 136: 185-199.
- 5- Simmon, V.F. 1979. In vitro mutagenicity assays of chemical Carcinogenes & related compounds with *Salmonella Typhimurium*. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 893-899.
- 6- Kier, L.D., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Pirval, M., & Rao, T.K. 1986. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay: A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 168: 69-240.
- 7- McMahon, R.E., Cline, J.C. & Thompson C.Z. 1979. Assay of 855 test chemical in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer Res.* 39: 682-693.
- 8- Swenson, D.H. & Kadlubar, F.F. 1981. Properties of Chemical Carcinogenes in Relation to their Mechanisms of Action. In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C. Felkner. Marcel Dekker Inc.: New York, Basel.
- 9- Kilbey, B.J. 1981. Ultraviolet Mutagenesis: A Comparison of Mechanisms in *E. coli* & Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*). In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C. Felkner. Marcel Dekker: New York, Basel.
- 10- Ong, T.M. 1981. Development of Neurospora Test Useful in the Detection of Chemical Mutagens & Carcinogenes in the Environment. In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C. Felkner. Marcel Dekker: New York, Basel.
- 11- Matney, T.S. 1981. Mutagenic Assays in Gram-Negative Bacteria for the Detection of Potential Carcinogenes: Activation by Mammalian Microsomal Factors. In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis" Ed. I.C. Felkner. Marcel Dekker: New York, Basel.
- 12- Felkner, I.C., Laumbach, A.D. & Harter, M.L. 1981. Development of a *B. subtilis* System to Screen Carcinogenes/Mutagens: DNA-Damaging & Mutation Assay. In "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis"

- Ed.I.C.Felkner.Marcel Dekker,Inc.:  
New York,Basel.
- 13- Watanabe,T.&  
Hirayama,T.2001.Genotoxicity of  
soil.J.Health Sci.47: 433-438.
- 14- Nath,J &krishna,G.1998.  
Safety screening of drugs in cancer  
therapy .Acta  
Haematologica.99:138-147
15. Rao,K.S.,Yong,M.D.,Show,M.S.&  
Parton,J.W.2004.Mutagenicity  
testing applied for regulation of  
developing products. Curr .  
Separations.20:141-144.
- 16- Al-Azawi, G.L., Al-Khafaji,  
Z.M., Al- Mashadani, W.Y. and  
Al-Hassan , E.A.M. Developing of  
bacterial mutagenic assay system  
for detedction of environmental  
and food mutagen. In Press.
- 17- Szybalski, W. 1952. Microbial  
selection .I- Gradient plate  
technique for study of bacterial  
resistance . Scince 116: 46-48.
- 18- Barry, A.L. 1986.Procedures  
forTesting Agents in Agar Media  
In" Antibiotics in Laboratory  
Medicine" Ed. V.Lorian . 2<sup>nd</sup>  
Edition. Willams & Wilkins:  
Baltimore, London.
- 19- Miller,J.H. 1972.Experiments  
in Molecular genetics . Cold  
Spring Harbor Laboratory :  
New York .
- 20- 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.
- 21- Hayes ,W.1968 .the  
Genetics of Bacteria and their  
Viruses . Blackwell Scientific  
Publications. Oxford ,  
England.
- 22- E ckardt,F.&  
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
- 23- Singleton,P &  
Sain sbury,D.1981.Dictionary  
of Microbiology. John Wiley  
Sons: Chichester,New York.
- 24.Coleman,D.C.,Pomeroy,H.,Estridge  
,J.K.,Keane,C.T.,Cafferky,M.T.  
Hone,R.&  
Foster,T.J.1985.Susceptibility to  
antimicrobial agents &  
analysis of Plasmids in gentamicin  
& methicillin resistant  
*Staphylococcus aureus* from  
Dublin  
hospitals.J.Med.Microbial.20:  
157-167.
- 25- Prescott,L.M.,Harley,J.P.&  
Klein,D.A.1999.Microbiology.4<sup>th</sup>  
Edition.  
McGraw Hill: Botson,New York.
- 26- WHO.1985.Guide to Short-Term  
Tests for Detecting Mutagenic&  
Carcinogenic  
Chemicals.Environmental Health  
Criteria # 51.
- 27- Cernakova ,M. , Kostalova ,  
D. ,Kettman, V. ,Plodova,  
M. Toth, J. and Drimal,  
J. 2002. Potential  
antimutagenic activity of  
berberine , a constituent  
of Mahonia aquifolium .

BCM. Complement,  
Altern. Med. 2 :2.  
28- Stent,G.S.&  
Calendar,R.1978.Molecular Genetics  
2<sup>nd</sup> Edition,W.H.  
Freemeeen & Company: San  
Francisco.  
29.Czys,A.,Jasieck,J.,Bogdan,A.,Szpik  
ewska,H.Wegrzyn,G.2000.

Genetically modified *Vibrio*  
*harveyi* strains as potential  
bioindicators  
of mutagenic Pollution of marine  
environments. Appl.Environ.  
Microbial.66:599-605.

## Developing of Bacterial Mutagenic Assay System for Detection of Environmental and Food Mutagens II – Intercalating Agents : Acridine Orange

\**Zahra M.Al-Khafaji*

\*\* *Gaith L.Al-Azawi*

\* Assistant Prof. Genetic Engineering of Biotechnology Institute for  
Postgraduate Studies/University of Baghdad

\*\* Higher Diploma. Genetic Engineering of Biotechnology Institute for  
Postgraduate Studies/University of Baghdad

### Abstract

Acridine orange (AO) as intercalating mutagen was used to check the response of isolates selected according to special characters mainly their response to the standard mutagen-Nitrosoguanidine-(NTG). AO was used at increasing concentration and under similar conditions used for NTG.

Treatment with AO resulted in reducing the survival fraction. The mutagenic effect as estimated by measuring some parameters such as mutants/ml, mutant yield ( $Y\chi$ ) and mutant frequency in comparison of NTG treatment. The results showed that AO induced streptomycin and rifampicin resistant mutants at less extent than NTG, which may be due to permeability as the AO is a large molecule with high molecular weight. The results also revealed that isolate G<sub>12</sub> with high mutability with AO as it was for NTG, therefore this isolate (G<sub>12</sub>) was the most sensitive isolate except that G<sub>27</sub> was more sensitive upon recording rifampicin resistance.