

تأثير عنصر الرصاص على طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لدنا بكتريا *Bacillus stearothermophilus* المعزولة محليا واستحثاته المطفر

خلود عبد الاله الخفاجي¹، صفاء عبد الرحمن¹، عبد الكريم قاسم¹، صفاء عبد الهادي¹، ياسمين عبد الله²، عصام²، فرقد²، محمود عبد الله رمضان¹

1- مركز الهندسة الوراثية والتقنيات الغذائية، دائرة البحوث الزراعية وتكنولوجيا الغذاء، وزارة العلوم والتكنولوجيا العراق
2- مركز بحوث سلامة الغذاء، بحوث البيئة والمواد الخطرة، وزارة العلوم والتكنولوجيا العراق

المستخلص

تم في هذا البحث دراسة تأثيرات عنصر الرصاص احد العناصر الثقيلة على بكتريا *Bacillus stearothermophilus* المعزولة محليا حيث تم استعمال طريقة الاطباق في تحديد التركيز الادنى المثبط للرصاص والذي كان 0.65 ملي مولاري . وأتضح من الدراسة وجود تأثير لعنصر الرصاص على نمو البكتريا حيث انخفض نمو البكتريا عند التراكيز 2 و4 ملي مولاري للرصاص مع ظهور اختلافات في اشكال الخلايا شملت قصر الخلايا واصطباغها الشديد بملون كرام وتشظي العديد منها لتصبح بشكل كروي مقارنة مع عينات السيطرة. كما لوحظ ظهور طفرات حساسة للحرارة لبعض منها مقاومة للمضاد الحيوى استربتومييسين وللتراكيز 0.2 و2 و4 ملي مولاري للرصاص. وبين الترحيل الكهربائي وجود اختلافات في نمط الترحيل الكهربائي مع زيادة الاختلاف مع التركيز 4 ملي مولاري ولم توجد اختلافات في نقاوة المستخلصات من حيث النسبة 280/260 والنسبة 230/260 وللمعاملات جميعها. ووضح طيف الامتصاص عند الطول الموجي 200-400 نانوميتر وجود اختلافات في شكل المنحنى للتركيز 0.2 ملي مولاري واختلفت قمة المنحنى البياني لتكون اعلى قمة في 232 نانوميتر لتراكيز 2 و4 مليمولاري للرصاص.

الكلمات الدالة: الرصاص - لاشعة فوق البنفسجية - دنا - بكتريا - *Bacillus stearothermophilus* - استحثاته المطفر

المقدمة

يعد التلوث البيئي من أهم المشاكل في البلدان الصناعية والمتطورة وهناك حاجة متزايدة للكشف عن الملوثات وضررها في البيئة المائية والزراعية ومن أهم الملوثات هي المعادن الثقيلة ومركباتها حيث لها علاقة مع التركيب الجيوكيميائي الطبيعي بالإضافة الى مدخلات الصناعة ووجود تلك الملوثات في البيئة المائية له اثر كبير على تلك البيئة لبقاء تلك الملوثات لعقود عديدة دون تحللها ويأتي تلوث التربة بالعناصر الثقيلة من استعمال المبيدات والاسمدة والفعاليات الصناعية المختلفة مثل التعدين وهناك صعوبة في إزالة الضرر الحاصل بالتلوث بالمعادن الثقيلة لعدم امكانية التحطيم الكيماوي لتلك المعادن(1). وقد تطورت العديد من الطرائق الكيماوية والبيولوجية للتحري عن سمية المواد واستعملت العديد من الاحياء لمثل هذه القياسات شملت الطحالب والسمك والدافنيا والعديد من الأنواع البكتيرية حيث تعد الاحياء المجهرية من أفضل الشواهد للتغيرات الحاصلة في الظروف البيئية حيث انها حساسة للتراكيز الضئيلة من العناصر الثقيلة(1). وتعد الاختبارات المعتمدة على البكتريا اهمها من حيث قلة التكلفة وسهولة الفحص أو الكشف والجودة وسرعة التأثير للكشف عن السمية وقد اعتمدت معظم هذه الاختبارات حول ظهور طفرات راجعة أو طفرات انخفاض في شدة التآلق الضوئي(2). ويؤثر وجود العناصر الثقيلة على جميع المجاميع الاحياء والأنظمة البيئية ومنها الفعاليات الميكروبية(3) ولوحظ تأثر المادة الوراثية الدنا بصورة كبيرة في العديد من الاحياء منها تكسر الدنا لبكتريا *Salmonella typhimurium* (4) والسمك الفضي الروسي(5). وينتشر في التربة العديد من الاحياء المجهرية المختلفة والتي من أهمها البكتريا من جنس *Bacillus* المكونة للسيرورات الداخلية. وينتشر النوع *B. stearothermophilus* المحب للحرارة في العديد من البيئات وهو من الأنواع البكتيرية الحساس للعديد من المواد مثل المضادات الحيوية وقد أستعمل هذا النوع بكثرة في التحري عن احتواء الحليب ومنتجاته للمضادات الحيوية(6).

وتهدف الدراسة الحالية الى تحديد التركيز المثبط الادنى من عنصر الرصاص لبكتريا *B. stearothermophilus* المعزولة محليا ودراسة الاختلافات في دنا لهذه العزلة من حيث التركيز والنقاوة ونمط الترحيل الكهربائي وتحديد الاختلافات في طيف الامتصاص للاشعة فوق البنفسجية للاطوال الموجية من 200 نانوميتر الى 400 نانوميتر عند استعمال تراكيز مختلفة لعنصر الرصاص وتقييم قابلية الرصاص التطفيرية لبكتريا *B. stearothermophilus*.

خلود عبد الاله الخفاجي وآخرون

المواد وطرائق العمل

العزلة البكتيرية:

نشطت سبورات العزلة المحلية البكتيرية *B. stearothermophilus* المحفوظة في التربة والمعزولة محليا من قبل الخفاجي(6).

تحديد التركيز المثبط الأدنى لعنصر الرصاص:

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى لعنصر الرصاص كما أشار لذلك Filali وآخرون (7) مع بعض التحوير حيث اضيفت تراكيز متضاعفة من محلول خزين لملح خلات الرصاص الى وسط لوريا برتاني الصلب لتعطي تراكيز متضاعفة نهائية تراوحت بين 10 ملي مولاري و0.1 ملي مولاري لعنصر الرصاص ولقحت الاوساط الصلبة بواسطة العزلة البكتيرية *B. stearothermophilus* وحضنت بدرجة 55 °م وفحصت الاطباق لظهور النمو ولمدة 72 ساعة وقورنت مع وسط السيطرة.

تأثير عنصر الرصاص في الوسط السائل:

م تتلفيح 20 مل من وسط لوريا برتاني السائل بوساطة 0.2 مل من المزروع البكتيري وحضن لمدة ساعتين بدرجة 55°م وسرعة 150 دورة/ دقيقة اضيف بعدها حجوم مختلفة من محلول خلات الرصاص الخزين ليعطي تراكيز نهائية (0.2 ، 2 ، 4) ملي مولاري واستمر التحضين بعدها لمدة 18 ساعة واخذت قراءات عند الطول الموجي 600 نانوميتر . صبغت شرائح مجهرية بملون كرام ولوحظت الاختلافات في شكل الخلايا وتجمعاتها وشكل السبورات ومواقعها وقورنت مع مزروع السيطرة وحضرت تخفيفات من المعاملات لتزرع على اوساط خالية من المضاد الحيوي ومجموعة تحوي ريفامبسين أو استربتومايسين وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 25°م او 55°م.

استخلاص الدنا البكتيري:

تم اعتماد طريقة الترسيب بالملح المحورة في استخلاص الدنا الكلي من العزلة *B. stearothermophilus* قيد الدراسة وكما هو وارد في(8) حيث اضيف الرصاص الى مزروع بكتيري بعمر ساعتين ليعطي تراكيز نهائية (0.2 ، 2 ، 4) ملي مولاري وتم حصاد المزروع البكتيري بعد 18 ساعة واستخلص الدنا من راسب الخلايا.

تحديد تركيز ونقاوة الدنا:

تم قياس تركيز الدنا وتحديد نقاوته باستعمال جهاز (USA thermoscientific nanodrop 2000) حيث قرأت نماذج الدنا عند الاطوال الموجية 230 ، 260 ، 280 ، 340 ويحسب بصورة مباشرة العلاقات التالية: 230/260 و 280/260 ليعطي وبصورة مباشرة تركيز الدنا ونقاوته دون الحاجة الى اجراء تخفيف أو معاملات اضافية وباستعمال كميات صغيرة من الدنا (2 مايكروليتر) وكما اشير اليه (9).

تحديد طيف امتصاص الدنا للاشعة فوق البنفسجية :

حددت الاختلافات في طيف امتصاص الدنا للاشعة فوق البنفسجية حيث حضر تخفيف 1:25 من نماذج الدنا وقرأ طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية بين الطول الموجي 200 الى 400 نانوميتر لكل نموذج اعتمادا على (10) وباستعمال جهاز(analytikjena specord 205 Germany).

الهجرة الكهربائية لهلام الاكاروز:

تم اعتماد الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز كما هو وارد في (11) باستخدام 1% هلام الاكاروز وبواقع 7 فولت/ سنتيمتر لنماذج الدنا المستخلص.

النتائج والمناقشة

حدد التركيز المثبط الأدنى لعنصر الرصاص باستعمال الاوساط الصلبة لتراكيز متضاعفة لعنصر الرصاص عوضا عن الاوساط السائلة حيث لوحظ ان اضافة محلول الرصاص الى الوسط السائل يؤدي الى ظهور عكورة في الوسط تتداخل مع نتائج الاختبار وقد يعود ذلك الى ان الرصاص يترسب في الارقام الهيدروجينية المتوسطة كما انه قد يرتبط مع مواد الوسط الزراعي من بروتينات وغيرها باواصر ثنائية مسببا الى ترسيبها او انه يرتبط مع ملح كلوريد الصوديوم احد مكونات وسط لوريا برتاني مؤديا لظهور عكارة الوسط وذلك يتفق مع ما جاء به Nies (12) الى ان العناصر الثقيلة تحمل الشحنة الموجبة وتكون لها القدرة على تكوين اواصر ثنائية مع العديد من المواد مرسبة اياها. وقد اوضحت النتائج ان

تأثير عنصر الرصاص على طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لدنا بكتريا *Bacillus stearothermophilus* المعزولة محليا واستحثاته المطفر

التركيز الادنى المثبط لعنصر الرصاص هو 0.65 ملي مولاري حيث لوحظ تثبيط لنمو البكتريا بصورة كاملة عند هذا التركيز بينما لوحظ وجود نمو واضح عند التركيز 0.325 ملي مولاري وكما هو واضح في جدول (1).

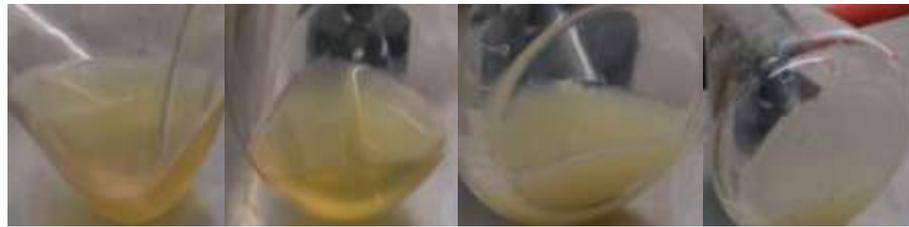
جدول (1): تأثير تركيزات الرصاص على نمو بكتريا *B. stearothermophilus* على وسط لوريا برتاني الصلب الحضن بدرجة 55°م ولمدة 48 ساعة.

نتيجة النمو	تركيز الرصاص (ملي مولاري)
-	10
-	5
-	2.5
-	1.25
-	0.65
+	0.325
+	0.162
+	0.081

+ : وجود نمو - : عدم وجود نمو

تتباين الاحياء المجهرية من حيث الحساسية والمقاومة للعديد من العوامل ومنها المعادن الثقيلة اعتمادا على انظمة وطرق اخذ وادخال المواد من قبل الكائن المجهرية الى داخل خلاياه ويؤدي وجود بعض مكونات الوسط الزراعي ذات الشحنة السالبة مثل الكلور الى تغيير في الجاهزية البيولوجية وسمية العنصر مؤديا الى ظهور اختلافات في التراكيز الدنيا المثبطة والمقاسة للطرق المختلفة وذلك يتفق مع (1) ويعتبر النوع البكتيري *B. stearothermophilus* من احياء التربة المجهرية المكونة للسيرورات والمحبة للحرارة ويعد التركيز الادنى المثبط القاس في هذه الدراسة ممثلا للحدود الطبيعية لعنصر الرصاص في العديد من البيئات حيث اشار Banerjee وآخرون (13) الى ان الحدود الطبيعية العليا في sluge هي 450 جزء بالمليون وان الوارد المتراكم الملوث للتربة هو 365 جزء بالمليون وبين Nies (12) ان التركيز الادنى المثبط للرصاص لبكتريا *Escherichia coli* هو 5 ملي مولاري.

وقد أظهر قياس الامتصاص الضوئي عند الطول الموجي 600 نانوميتر ان المزرع البكتيري يبدأ بالزيادة بالنمو ولمدة ساعتين التحضين بدليل ارتفاع في الامتصاص الضوئي ويبدأ النمو بالتراجع عند اضافة تراكيز الرصاص المختلفة وتتنخفض عكارة الوسط بعد 18 ساعة تحضين بصورة كبيرة مقارنة مع وسط السيطرة حيث اعطت معاملة السيطرة قراءة 1.2 امتصاص ضوئي مقارنة مع 0.7 للتركيز 0.2 ملي مولاري و0.26 للتركيز 2 ملي مولاري وقراءة 0.55 للتركيز 4 ملي مولاري وقد يعزى سبب ارتفاع عكورة الوسط لمعاملة 4 ملي مولاري عن عكورة تركيز 2 مليمولاري ان الرصاص ذي التركيز الاعلى يعمل على ترسيب بعض بروتينات الوسط وتكوين معقدات غير ذائبة معها اضافة لما تقدم يكون المزرع البكتيري بشكل متحلل ومخاطي عند تركيزي (2 و 4) ملي مولاري وكما هو واضح في شكل (1).



4

3

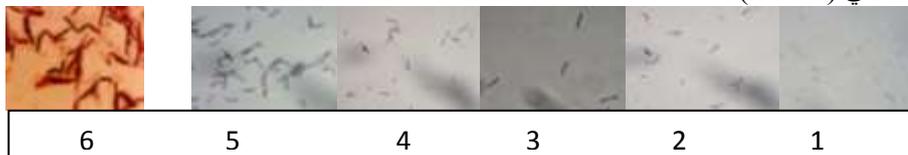
2

1

شكل (1) . المزرع البكتيري للعزلة المحلية للنوع *B. stearothermophilus* في الوسط الزراعي السائل وبوجود تراكيز مختلفة من عنصر الرصاص (1-مزرع السيطرة ، 2- تركيز 0.2 ملي مولاري من الرصاص ، 3- تركيز 2 مليمولاري من الرصاص ، 4- تركيز 4 ملي مولاري من الرصاص)

خلود عبد الاله الخفاجي وآخرون

بين الفحص المجهرى لشرائح صبغت بملون كرام عدم وجود اختلافات في شكل الخلية عند استعمال تركيز 0.2 ملي مولاري والذي هو اقل من التركيز الادنى المثبت للخصائص بينما لوحظت اختلافات عديدة في التراكيز العالية (2 و4) ملي مولاري حيث ظهرت الخلايا بشكل قصير متصبغة بشكل اكبر من السيطرة والعديد منها يظهر بشكل دائري او متشظي (شكل 2).



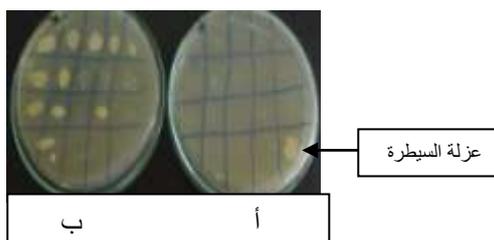
شكل (2). الفحص المجهرى لخلايا صبغت بملون كرام للعزلة المحلية *B. Stearothermophilus* (1- شكل لوسط السيطرة ، 2-3 شكل لتركيز 0.2 ملي مولاري من الرصاص ، 4 و5- شكل لتركيز 2 مليمولاري من الرصاص ، 6- شكل لتركيز 4 ملي مولاري من الرصاص).

قد يعزى سبب ظهور الاختلافات في اشكال الخلايا الى ظهور بعض الطافرات في المزرع البكتيري او تجميع الرصاص على الجدران الخلوية لبكتريا *B. stearothermophilus* او استعمال احدى اليات ادخال الرصاص السبب في ظهور الخلايا بشكل اسماك ولون اغمق. كما ان للتراكيز الاكبر من التركيز الادنى المثبت القدرة على قتل البكتريا وجعلها بشكل متشظي او استحاث الطفرات الوراثية. واختلفت اشكال المستعمرات على الوسط الصلب من حيث الشكل والمظهر وسطح الخلايا (شكل3).



شكل(3): مزرع بكتيري لطفرات من العزلة المحلية لبكتريا *B. stearothermophilus* المعاملة بعنصر الرصاص

أظهرت بعض المستعمرات الطافرة بشكل صغير بحجم رأس دبوس واختلفت درجة حرارة النمو حيث اظهرت المستعمرات النامية القدرة على النمو بدرجة حرارة منخفضة 8-25م وعدم القدرة على النمو بدرجة 55م وامتلك العديد من المستعمرات المقاومة لمضادى الستريبتومايسين والريفاميسين مقارنة مع الخلايا غير المعاملة بالرصاص ويوضح الشكل (4) بعض هذه الطفرات.



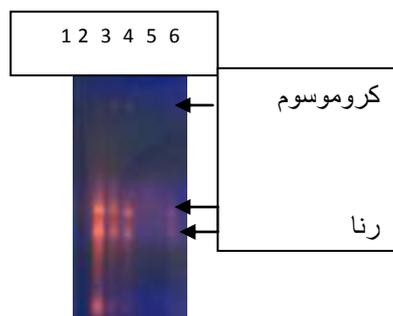
شكل(3). نمو خلايا طافرة من العزلة المحلية *B. stearothermophilus* بدرجة حرارة 25م

أ- تحضين الطافرات بدرجة 55م: ب- حضن الطافرات بدرجة 25م
تبين ان عدد من الطفرات الحساسة للحرارة كانت مقاومة لمضادى الستريبتومايسين والريفاميسين مما يشير الى ان عنصر الرصاص ادى الى حصول طفرات متعددة في العزلة الطافرة الواحدة وقد يكون سبب ذلك ان البكتريا تطور العديد من الليات لتقاوم بها تراكيز الايونات المعدنية الثقيلة ومن هذه الليات ارتباط المعدن الثقيل داخل جسم الخلية البكتيرية مما يؤدي الى ارتباطه مع بعض المكونات المهمة من بروتينات وانزيمات ومواد وراثية خلوية مؤديا الى حصول الطفرات الوراثية حيث اشار (3و13) الى التأثير السام والمطر للعناصر الثقيلة حتى في تراكيزها الواطئة حيث تؤثر في جميع الاحياء والنظم البيئية بما فيها الفعاليات الحيوية الميكروبية كما ان القابلية التصليحية لنظام اصلاح الدنا اهمية في اصلاح الضرر الحاصل للدنا وحصول الطفرات في المجموع البكتيري ويعد ظهور الطفرات المقاومة للمضاد الحيوي

تأثير عنصر الرصاص على طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لدنا بكتريا *Bacillus stearothermophilus* المعزولة محليا واستحثاته المطفر

احد اهم الطفرات الملاحظة في المجموع البكتيري حيث اشار(14) الى تعدد الجينات المسؤولة لمضاد الريفاميسين والتي من السهولة ان تطفر بواسطة المواد المطفرة.

اوضحت النتائج تأثر نمط الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز لنماذج الدنا المستخلصة بعد المعاملة بعنصر الرصاص وللتركيز المستعملة جميعها حيث لوحظ اختلاف شكل المسحة المترتبة عن تكسر نموذج الدنا المستخلص لتكون المسحة واسعة وذات احجام دنا مختلفة لنموذج السيطرة لتكون مسحة قليلة ذات حجوم دنا صغيرة قريبة الى حزمة الرنا وكما هو واضح في شكل(5).



شكل(5). الترحيل الكهربائي لمستخلصات دنا بكتريا *B. stearothermophilus* المعاملة بالرصاص باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 1% و5 فولت/ سم. (1- نموذج السيطرة ، 2- تركيز 0.2 ملي مولاري رصاص ، 3- تركيز 2مليمولاري رصاص ، 6- نموذج 4 ملي مولاري رصاص)

انخفضت تراكيز الدنا المستخلصة بشكل كبير بين تركيز واخر لتصل الى 291.9نانوغرام / مايكروليتر للتركيز 4 ملي مولاري مقارنة مع 3288.8 نانوغرام/ مايكروليتر لنموذج السيطرة وانخفضت كذلك قراءات الامتصاص الضوئي للبروتين عند 280 نانوميتر نسبة لنموذج السيطرة لتصل الى 2.7 مقارنة مع 32.1 لنموذج السيطرة وقد تعزى سبب تلك الاختلافات في تراكيز الدنا وقراءات البروتين الى انخفاض في نموالبكتريا وقله في اعدادها في المزارع البكتيرية المعاملة مقارنة مع مزرع السيطرة وتعد نماذج الدنا نقية من البروتين عندما تكون نسبة 280/260 اعلى من 1.8 والتي هي النسبة المقبولة لقراءة 280/260 وقد تبين ان نقاوة الدنا من البروتين لنموذج السيطرة مقارنة لنقاوة نموذج دنا المعاملة بتركيز 0.2 مليمولاري وتختلف النسبة قليلا للمعاملة بتركيز 2ملي مولاري والمعاملة 4 ملي مولاري بينما سجلت النسبة 230/260 اختلافات بين المعاملات حيث لوحظ انخفاض النسبة عن 2 لنموذج السيطرة وانخفضت المعاملات 2 و4 ملي مولاري بصورة اكبر عن النسبة المقبولة (جدول 2). قد يعود سبب الانخفاض في نسبة 230/260 الى وجود بعض المواد التي تمتص الضوء عند الطول الموجي 230 مما يوضح احتواء مستخلصات الدنا على بعض الشوائب مثل السكريات والتي قد تعود الى الفعل المطفر والسام لعنصر الرصاص كما هو واضح في جدول (2).

جدول (2). قرأت الامتصاص الضوئي لمستخلصات دنا بكتريا *B. stearothermophilus* المعاملة بتركيزات مختلفة من الرصاص.

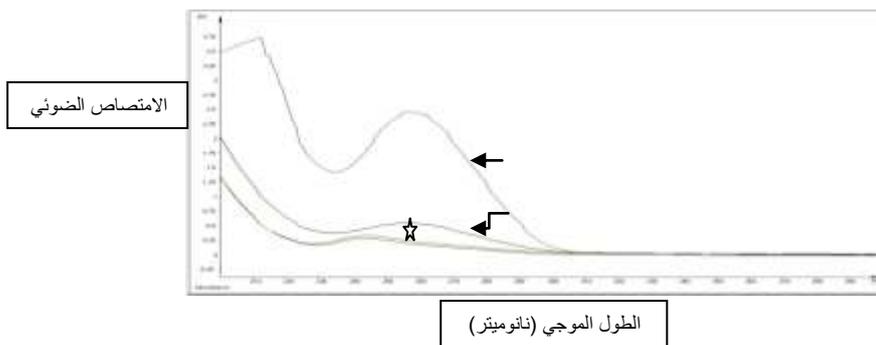
النماذج	الامتصاص الضوئي			
	عند 260 نانوميتر	عند 280 نانوميتر	القراءة لنسبة 280/260	القراءة لنسبة 230/260
السيطرة	65.77	32.162	2.05	1.63
0.2 مليمولاري	14.29	7.018	2.04	1.59
2 مليمولاري	9.22	4.759	1.94	1.34
4 ملي مولاري	5.839	2.7	2.12	0.73

وقد يعزى سبب الاختلافات بين المعاملات من حيث النسبة المقاسة 280/260 ان اعلى امتصاص للدنا عند الطول الموجي 260 نانوميتر ويعتمد على امتصاص القواعد النتروجينية الاربعة المكونة للدنا للاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260 نانوميتر ولكل قاعدة نتروجينية نسبة معينة من 280/260 و تختلف تلك النسب بينها اشد الاختلاف

خلود عبد الاله الخفاجي وآخرون

حيث يعطي الكوانين 1.15 بينما تصل الى 4.5 للادينين وقد يكون ظهور الطفرات الوراثية في المجموع البكتيري دور في تغيير تلك النسب لاختلاف المحتوى من القواعد النتروجينية المكونة للدنا المستخلص وقد يؤثر الرصاص في عملية تصنيع البروتين الخلوي وتؤخذ نسبة 280/260 لمعرفة نقاوة النموذج من حيث البروتين والنسبة 230/260 لمعرفة نقاوة النموذج من السكريات والفينولات وبعض المواد الملوثة الاخرى وقد اشار(15) الى تلك العلاقات لطيف امتصاص نموذج الدنا.

ولوحظ اختلاف في طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية بين 200-400 نانوميتر لنماذج الدنا المستخلصة من المعاملات جميعها حيث وجد اختلاف في شكل حافات المنحنى البياني للتركيز 0.2 مليمولاري وعدم تأثر قمة المنحنى بينما اختلف شكل حافات المنحنى وموقع قمته لتصبح عند الطول الموجي 232 نانوميتر للتركيز 2 و4 ملي مولاري وكما هو واضح في شكل (5).



شكل(5): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لنماذج دنا العزلة البكتيرية *B. stearothermophilus* المعاملة بتركيز مختلفة من الرصاص
 (←) نموذج دنا لمعاملة السيطرة: ← = نموذج دنا لمعاملة 0.2 ملي مولاري: ☆ = نموذج دنا لمعاملة 2 ملي مولاري
 رصاص: نموذج معاملة 4 ملي مولاري رصاص

وقد يعود سبب ذلك الى حصول تغييرات في المحتوى الخلوي للبكتريا عند وجود عنصر الرصاص في الوسط الزراعي للبكتريا كما ان انحراف قمة المنحنى البياني عن 260 نانوميتر لتصبح عند 232 نانوميتر دليل على وجود مواد اخرى تشمل السكريات الفينولات والاحماض الامينية ذات الامتصاص العالي والتي تمتص الضوء عند الطول الموجي القريب من 232 نانوميتر. وقد تعود تلك الاختلافات في طيف الامتصاص الى التغيرات البايوكيميائية ذات العلاقة مع ارتباط عنصر الرصاص او تأثيراته وتغيره للمحتوى الوراثي الخلوي وذلك يتوافق مع ما جاء به كل من (4) من تكسر الدنا المنقى لبكتريا *S. typhimurium* عند استعمال تراكيز مختلفة للعناصر الثقيلة مع مواد مكونة للايونات الحرة كما درس كل من (5) و(16) اليات تكسر الدنا في خلايا الكبد للكرب الروسي الفضي وخلايا الكلية والمتسببة عن تواجد الكاديوم احد العناصر الثقيلة واعتمد (17) فحص الكوميت في التحري عن المواد الملوثة للرواسب البحرية في اجنة السمك zebra fish ووجد(18) الاضرار الحاصلة في دنا ودهون الفطر *Boletus edulis* بعد تعرضه الى العناصر الثقيلة.

المراجع

- 1- Kamala- Kannan, S. and Lee, K.J. (2008). Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* isolated from Sunchon Bay sediments, South Korea. *Biotechnology*, 7(1): 149- 152.
- 2- Kim, B. C.; Park, K. S.; Kim, S. D. and Gu, M. B.(2003). Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a *Daphnia magna* bioassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 821- 826.
- 3- Gremion, F.; Chatzinotas, A.; Kaufmann, K. and Von Sigler, W. (2004). Impact of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve- month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 273- 283.
- 4- Keyhani, E.; Abdi- Oskouei, F.; Attar, F. and Keyhani, J. (2007). DNA strand breaks by metal- induced oxygen radicals in purified *Salmonella typhimurium* DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091:52-64.

تأثير عنصر الرصاص على طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لدنا بكتريا *Bacillus stearothermophilus* المعزولة محليا واستحثاته المطفر

- 5- Wu, C.; Wang, L.; Liu, C.; Gao, F.; Su, M.; Wu, X. and Hong, F. (2008). Mechanism of Cd²⁺ on DNA cleavage and Ca²⁺ repair in liver of silver crucian carp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(1):43- 51.
- 6- خلود عبد الاله الخفاجي (2009). استخلاص انزيمات التقييد من عزلات محلية لانواع جنس *Bacillus*. المؤتمر العلمي السادس لكلية التربية /جامعة تكريت/ قسم علوم الحياة 24-25 اذار
- 7- Filali, B. K.; Taoufik, J.; Zeroual, Y.; Dzairi, F. Z.; Talbi, M. and Blaghen, M.(2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*, 41: 151-156.
- 8- Al-khafaji, K. A. and Al- Thwani, A.N. (2011). A comparative study among clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* at their antibiotic resistance and plasmid profile. *J. Biotechnology Research Center (special ed.)*,15(2):3-9
- 9- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- 10- ناقص
- 11- **Sambrook** , J.; Fritsh, F. E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : A laboratory manual 2nd Ed . Cold spring Harbor Laboratory press . New York .*
- 12- Nies, D. H.(1999). Microbial heavy metal resistant. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51: 730- 750.
- 13- Banerjee, D.; Bairagi, H.; Mukhopadhyay, S.; Pal, A.; Bera, D. and Ray, L.(2010). Heavy metal contamination in fruits and vegetables in two districts of west Bengal, India. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*,9(9): 1423- 1432.
- 14- Perscott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (1999). *Microbiology*. 4th ed. WCB McGraw-Hill: Boston.
- 15- Palma, B. F.; Ferrari, A. B.; Bitar, R. A.; Cardoso, M. A. G.; Martin, A. A. and Martinho, H. de Silva.(2008). DNA extraction systematic for spectroscopic studies. *Sensors*, 8: 3632-3632.
- 16- Wu, C.; Hong, F.; Liu, C.; Wang, Y.; Wu, K.; Gao,F. and Yang, F.(2006). Relative mechanism of Ce³⁺ relieves DNA damage caused by Cd²⁺ in the kidney of silver crucian carp. *Biological Trace Element Research*, 113(3): 231- 245.
- 17- Kosmehl, T.; Krebs, F.; Manz, W.; Braunbeck, T. and Hollert, H.(2007). Differentiation between bioavailable and total hazard potential of sediment- induced DNA fragmentation as measured by the comet assay with Zebrafish Embryos. *Journal of Soils and Sediments*, 7(6): 377- 387.
- 18- Collin- Hansen, C.; Ahdersen, R. A. and Stednnes, E.(2005). Damage to DNA and lipids in *Boletus edulis* exposed to heavy metals. *Mycological Research*, 109(12): 1386- 1396.

خلود عبد الاله الخفاجي وآخرون

**The effect of lead on the UV scan of DNA from the local isolate
Bacillus stearothermophilus and induction of mutation**

**Khlood A. A. Al- Khafaji¹, Saffa abid al Rahman¹, Abid Al Kareem Kasem¹, Saffa
Abid Al Hadi¹, Yasmin Abid Allah², Essam², Farqad², Mahmood Abid Alah Ramadhan¹**

1- Genetic Engineering and Food Biotechnology Center, Agricultural and Food
Technology Directorate, Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq

2- Food Safety Center, Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq

ABSTRACT

A study of the effect of lead on a local isolate of *Bacillus stearothermophilus* was done in this research. Agar diffusion method was used for determination of minimum inhibition concentration which reaches to 0.65 milimolar. The growth of bacteria was decreased at 2 and 4 mM with differences in cells shape include short, high pigmentation of gram stain and fragmentation of cell to be coccoid comparing with control growth. Also, mutants of heat sensitive and some of streptomycin resistant were seen at 2 and 4 mM. Differences on the agarose gel electrophoresis were happened for all concentrations. No differences for DNA purity at 260/280 and 260/ 230 were detected for all treatments. UV scan at 200-400 nm was done to all DNA samples and differences of curve shape at 0.2 mM lead while the location of DNA peak was detected at 232 nm for 2 and 4 mM treatments.