فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۲۳، جلد ۶، شماره ۴، پائیز ۹۲ صفحه ۶۳ تا ۶۶

بررسی جهش زایی و سرطان‌زایی نانوذرات بیسموت با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ و میکروزوم کبد موش (S۹)

بهار شمس کیلانی[۱]، صدیقه مهرابیان[۲]، فرزانه حسینی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی،تهران. ایران. Shams Bahar@yahoo. com

۲-دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، استاد گروه میکروبیولوژی، تهران. ایران.

۳-دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، استادیار گروه میکروبیولوژی، تهران. ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۹ تاریخ پذیرش:۹۲/۹/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از نانو ذرات به علت ارزانی، مفید بودن و خاصیت ضد میکروبی بالای آن ها، در زمینه های مختلف رو به افزایش است. بنابر این باید به مضرات احتمالی آن ها نیز توجه شود و در غلظتی استفاده شوند که جهش زا و سرطان زا نباشد. لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات جهش زایی و سرطان زایی نانوذرات بیسموت با سایز ٥٦ nm و در سه غلظتppm ۳۹/۱، ۷۸/۱، ۱٥٦/۲٥ انجام گرفت.

روش کار: در ابتدا جهش زایی ماده آزمون ایمز با استفاده از سالمونلا تیفی موریومTA۱۰۰ سنجش و سرطان زایی آن جداگانه با میکروزوم کبدی موشS۹ افزوده و شمارش کلنی های برگشتی انجام گردید. نتایج حاصل از این آزمایش به کمک نرم افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در حضور میکروزوم کبد موش تعداد کلنی های برگشتی در مقایسه با عدم حضور این آنزیم، کاهش یافته و این بدین معنی است که اثر جهش زایی و سرطان زایی با حضور این آنزیم کاهش می یابد.

نتیجه گیری: طبق نتایج پژوهش حاضر نانوذرات بیسموت فعالیت جهش زایی و سرطان زایی از خود نشان نداد.

واژه های کلیدی: نانوذرات بیسموت، سالمونلا تیفی موریومTA۱۰۰، تست ایمز، میکروزوم کبدی موشS۹

مقدمه

محیط اطراف ما ، مملو از مواد سرطان زاست. این عوامل قادرند با تغییر در توالی اسیدهای نوکلئیک DNA باعث القا موتاسیون و بروز سرطان شوند. شناسایی مواد یا عوامل القاکننده جهش نقش مهمی را تعیین سلامت، ایفا می نماید، زیرا این عوامل جهش زا، گاهی سبب ایجاد آسیب به سلول های پایه جنینی و موتاسیون قابل توارث از نسلی به نسل دیگر می شوند. بدیهی است که، دسترسی به روش ارزان، آسان و سریع، برای شناسایی مواد جهش زا از اهمیت ویژه ای برخوردار است(۱۶). یکی از روش های ساده و مهم، بررسی موتاسیون زایی ترکیبات شیمیایی، استفاده از باکتری هاست. به دلیل تکثیر سریع و شناسایی ویژگی‌های بیوشیمیایی و ژنتیک باکتری‌ها، امکان گسترش سویه های خاص حساس به محدوده وسیعی از موتاژن‌ها به آسانی میسر می‌باشد(۱۲). در سال ۱۹۶۴، Ames تحقیقات اولیه در مورد فعالیت جهش زایی را بر روی بیولوژی مولکولی باکتری سالمونلا انجام داد. او بررسی کرد که چگونه ژن ها در پاسخ به حضور اسید آمینه هیستیدین روشن و خاموش می شوند و مواد جهش زا چگونه کنترل این مکانیسم را مختل می کنند(۱۲). سالمونلا باسیل گرم منفی، با ابعاد ۵- ۲ × ۱/۵ – ۰/۷ میکرون، هوازی و بی هوازی اختیاری و شیمیوارگانوتروف است و درجه حرارت بهینه برای رشد این باکتری ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد(۶). بهترین و متداول‌ترین روش برای تعیین پتانسیل جهش

زایی و سرطان زایی مواد شیمیایی و داروهای جدید شناسایی موتاسیون برگشتی در سالمونلا تیفی موریوم، به کمک تست ایمز است. این روش، یک تست باکتریایی کم هزینه، کوتاه مدت و آسان است که در دهه ۱۹۷۰ توسط Ames و همکارانش پایه گذاری شد. در سال ۱۹۸۲، مطالعاتی در ارتباط با این آزمون، برروی بیش از ۵۰۰۰ نوع ماده شیمیایی، از سوی مرکز مطالعات و تحقیقات جهش زایی محیط زیست انجام گرفت (۶). در تست ایمز از سوش های مختلف باکتری سالمونلا تیفی موریوم استفاده می‌شود. هر کدام از این سوش ها، دارای یک موتاسیون انتخابی در اپرون هیستیدین خود می-باشند.این موتاسیون مانع از انجام یک فعالیت متابولیک ضروری می شود. در صورتی‌که سویه وحشی یا پروتوتروف (فنوتیپ His^+) قادر است با استفاده از نیتروژن غیر آلی (فسفات آمونیوم) و در حضور منبع کربن مناسب (گلوکز)، این اسید آمینه ضروری را بسازد (۴). سوش های سالمونلا تیفی موریوم در تست ایمز، اگزوتروف His^- بوده و زمانی که سویه های آزمایشی بر روی پلیت های آگار حداقل حاوی مقدار ناچیزی His و در حضور ماده مورد آزمایش رشد داده می شوند، فقط آن دسته از باکتری ها که جهش برگشتی یافته اند، قادر به رشد و تشکیل کلنی خواهند بود. به همین دلیل این تست اکثراً به عنوان بررسی برگشت موتاسیون، بیان می گردد(۱۲). تمام سویه ها با ایجاد یک موتاسیون خاص، در اپرون His خود به تنهایی قادر به سنتز این اسید آمینه نیستند. تغییرات ژنتیکی با موتاسیون های دیگری که حساسیت سویه ها را نسبت به مواد موتاژن افزایش می دهند عبارتند از:

- ❖ یک موتاسیون کاهشی در ژن uvrB- bio در تمام سویه ها (به‌جز سویه TA۱۰۲). موتاسیون کاهشی uvrB سبب حذف مکانیسم سیستم ترمیم برشی (Exition repaire) و آسیب به DNA می شود. موتاسیون کاهشی در ژن بیوتین، باکتری را نیازمند به اسید آمینه بیوتین می سازد.
- ❖ موتاسیون rfa در تمام سویه ها سبب ایجاد یک لایه لیپوپلی ساکاریدی ناقص (LPS) در سطح باکتری شده و باکتری را نسبت به مواد شیمیایی درشت (بزرگ)که از دیواره سلول طبیعی عبور نمی کنند، نفوذپذیرتر می سازد.
- ❖ وجود پلاسمید۱۰۱ PkM در سویه های TA۱۰۴،TA۹۸،TA۹۷،TA۱۰۰،TA۱۰۲ سبب افزایش موتاسیون زایی شیمیایی یا القایی توسط اشعه UV شده و این پلاسمید، باکتری را نسبت به آمپی سیلین مقاوم می سازد.

سویه TA۱۰۰ علاوه بر پلاسمید pkm۱۰۱ دارای یک پلاسمید چند نسخه ای۱ pAQ است که حامل ژن hisG428 بوده که یک ژن مقاوم به تتراسایکلین است. سویه های واجد پلاسمیدهای فوق را سویه های R-factor نامند (۱۴، ۱۲). ویژگی منحصر به فرد این آزمون، استفاده از میکروزوم کبدی(S۹) برای فعال کردن برخی مواد جهش زا و سرطان زا است. زیرا، بسیاری از این ترکیبات برای بروز ویژگی های جهش زایی یا سرطان زایی باید از نظر متابولیکی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال شوند و از آن‌جا که باکتری سالمونلا قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا یک عصاره استریل میکروزومی از بافت پستانداران را می توان به تست جهش زایی اضافه نمود. میکروزوم ها حفره های غشایی کوچکی هستند که در یاخته های زنده و سالم دیده نشده و نتیجه تکه تکه شدن قسمت هایی از سیستم غشایی درون یاخته ای و نیز شکسته شدن لوله ها و کیسه های شبکه های آندوپلاسمی می باشند(۱۳، ۹، ۷، ۵، ۳، ۲، ۱). Ames و همکارانش ارتباط بین سرطان زایی و جهش زایی را حدود ۸۳٪ گزارش نمودند (۱۳). بیسموت عنصر شیمیایی با عدد اتمی ۸۳ فلز ضعیف ۳ ظرفیتی ، سفید

بلورین، سنگین و شکننده ای است که اثر خفیفی از رنگ صورتی در آن وجود دارد و از نظر شیمیایی شبیه آرسنیک و آنتیموان است. بیسموت از تمامی فلزات سنگین تر است و به‌جز جیوه از تمامی عناصر خاصیت هدایت حرارتی کمتری دارد. از ترکیبات بیسموت که فاقد سرب باشند، در ساخت لوازم آرایشی و بهداشتی و اهداف پزشکی استفاده می‌شود. هم‌چنین بیسموت به صورت قرص های خوراکی جهت درمان ناراحتی های گوارشی ناشی از هلیکوباکترپیلوری استفاده می گردد (۱۰). با توجه به استفاده روز افزون از نانوذرات در عرصه های مختلف پزشکی، دندانپزشکی تحقیق حاضر با هدف بررسی خاصیت جهش زایی و سرطان زایی نانوذرات بیسموت با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA ۱۰۰ و میکروزوم کبدی موش(S۹) انجام گردید. در تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور، مطالعه مشابهی که به بررسی خاصیت جهش زایی و سرطان زایی نانوذرات بیسموت بپردازد، به‌دست نیامد. لذا این بررسی نخستین تحقیق با این اهداف است.

مواد و روش ها

این تحقیق به روش آزمایشگاهی انجام شد. سویه باکتری در این پژوهش، سوش TA ۱۰۰ مورد تایید قرار گرفت(۱۲، ۶) و نتیجه کار با این سوش دنبال شد. سوش مذکور وارد محیط کشت نوترینت براث شده و جهت احیاسازی، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت، برروی محیط کشت نوترین آگار در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد (۱۲، ۶). آزمون های تایید ژنوتیپ سوش TA۱۰۰، حساسیت به کریستال ویوله جهت تایید جهش rfa، حساسیت به پرتو uv جهت تایید جهش uvrB، حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک پنی سیلین جهت تایید وجود یا عدم وجود پلاسمید (R-factor)، عدم قدرت رشد در محیط فاقد اسید آمینه هیستیدین جهت تایید نیازمندی به هیستیدین و عدم قدرت رشد در محیط فاقد اسید آمینه بیوتین تاییدی بر نیازمندی TA۱۰۰ به بیوتین بود. برای تهیه S۹، موش ها به مدت ۲۴ ساعت گرسنگی داده شدند تا ترشح آنزیم های کبدی به واسطه گرسنگی تحریک شوند و افزایش یابند، سپس با گردن زدن، حیوان را کشته و کبد با یک پنس استریل خارج گردید. سپس کبدها در کلرید پتاسیم سرد ۰/۱۵مولار استریل و تازه تهیه شده، چندین بار شستشو داده شدند تا گلبول های قرمز که مانع از فعالیت آنزیم های سیتوکروم P۴۵۰ می‌گردند و خارج می شوند. پس از شستشو، کبدها در یک هاون چینی استریل با قیچی استریل خرد و کاملاً له شدند. سپس به ازای هرگرم کبد موش cc ۳ از کلرید پتاسیم (۰/۱۵ مولار) به کبدها اضافه کرده و وقتی مخلوط هموژنی بدست آمد، در داخل لوله های سانتریفوژ استریل توزیع و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۷۰۰rpm(۹۰۰۰g) و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. بدین ترتیب گلبول های قرمز جدا و مایع رویی شیری رنگ، قابل استفاده شد. سپس طبق دستورالعمل ایمز، با کوفاکتورهای لازم در دمای۴ درجه سانتی گراد مخلوط گردید (۱۱).

آزمون جهش زایی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰

از هریک از رقت های تهیه شده جهت مطالعه جهش زایی نانوذرات بیسموت (غلظتی که باکتری جهش را نکشد) که توسط آزمون MIC و MBC این غلظت ها ۱ppM، ۳۹/۱، ۷۸/۱، ۱۵۶/۲۵ به‌دست آمدند، استفاده گردید. مراحل کار بدین صورت بود که از رقت‌های مذکور نانوذرات بیسموت توسط سمپلر استریل مقدار ۱۰۰میلی لیتر به لوله های حاوی ۲ میلی لیتر تاپ آگار و ۰/۲میلی لیتر محلول هیستیدین-بیوتین و ۰/۱میلی لیتر کشت تازه شبانه سوش TA۱۰۰ افزوده شد. سپس محتویات لوله ها، پس از ۳ ثانیه تکان دهی توسط شیکر

به‌طور یکنواخت در سطح پلیت‌های گلوکز آگار حداقل گسترده شدند. بعد از سفت شدن آگار ، پلیت ها را وارونه کرده و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. هم چنین کنترل های مثبت و منفی نیز در این آزمون در نظر گرفته شدند. کنترل منفی شامل ۰/۲ میلی لیتر محلول هیستیدین- بیوتین، ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل و ۲ میلی لیتر تاپ آگار و ۰/۱ میلی لیتر سوش تازه شبانه‌TA۱۰۰ می باشد که پس از ۳ ثانیه تکان دهی برروی پلیت های گلوکز آگار حداقل توزیع و در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند (۱۲، ۶). حضور کنترل منفی برای نشان دادن تعداد باکتری هایی که جهش برگشتی خود به خودی می یابند، ضروری است. کنترل مثبت این آزمون برای مقایسه نتایج شامل ۱۰۰ میلی لیتر محلول آزیدسدیم به عنوان یک ماده جهش زای قوی، ۰/۱ میلی لیتر کشت تازه شبانه سوش آزمایشی همراه با ۰/۲ میلی لیتر محلول هیستیدین- بیوتین در درون ۲ میلی لیتر محیط تاپ آگار در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد بود. پس از پایان دوره گرماگذاری پلیت ها از انکوباتور خارج شده و تعداد کلنی های برگشتی در پلیت های آزمایشی و کنترلی شمارش گردید (۱۲، ۶).

آزمون سرطان زایی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ و میکروزوم کبد موش S۹

در این آزمون علاوه بر افزودن ۰/۱ میلی لیتر کشت تازه شبانه سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰، ۰/۲ میلی لیتر محلول هیستیدین – بیوتین و غلظت مورد نظر از نانوذرات بیسموت ، به ۲ میلی لیتر محیط تاپ آگار، ۰/۵ میلی لیتر از مخلوط S۹ تازه تهیه شده نیز به لوله ها اضافه گردید و پس از ۳ ثانیه تکان دهی، محتویات لوله ها برروی سطح پلیت های گلوکز آگار حداقل توزیع و پس از بسته شدن محیط، پلیت ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. به عنوان کنترل مثبت از آزید سدیم (۱۰۰ میلی لیتر) و به عنوان کنترل منفی از آب مقطر استریل (۱۰۰ میلی لیتر) طبق روش گفته شده در بالا استفاده شد. لازم به ذکر است، همه آزمایشات در سه تکرار هم‌زمان انجام شدند (۸، ۶).

تحلیل آماری

در این تحقیق، اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزار SPSS و Anova مورد آزمون قرار گرفت و نتایج به صورت جداول و نمودارهای میله ای و جعبه ای مورد تحلیل قرار گرفتند. مرز معنی داری روی $P \leq ۰/۰۵$ قرار داده شد.

نتایج

در تایید ژنوتیپ سوش سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ ، سویه جهش یافته به علت فقدان نسبی سد لیپوپلی ساکارید در پوشش سطح باکتری، رنگ کریستال ویوله به داخل دیواره نفوذ کرده و باعث مرگ باکتری ها و تشکیل هاله ۱۴ میلی متر شد. مقاومت به آمپی سیلین به علت وجود پلاسمید R-factor در سویه مورد آزمایش مشاهده شد. عدم رشد در ناحیه پرتو دیده مشاهده گردید که نشان دهنده جهش uvrB می باشد (جدول ۱).

جدول۱- مشخصات ژنوتیپی سالمونلا تیفی موریوم سویه TA۱۰۰

سویه مورد آزمایش	جهش Rfa	پلاسمید R-Factor	جهش UVrb
سالمونلاتیفی موریوم TA۱۰۰	+	+	+

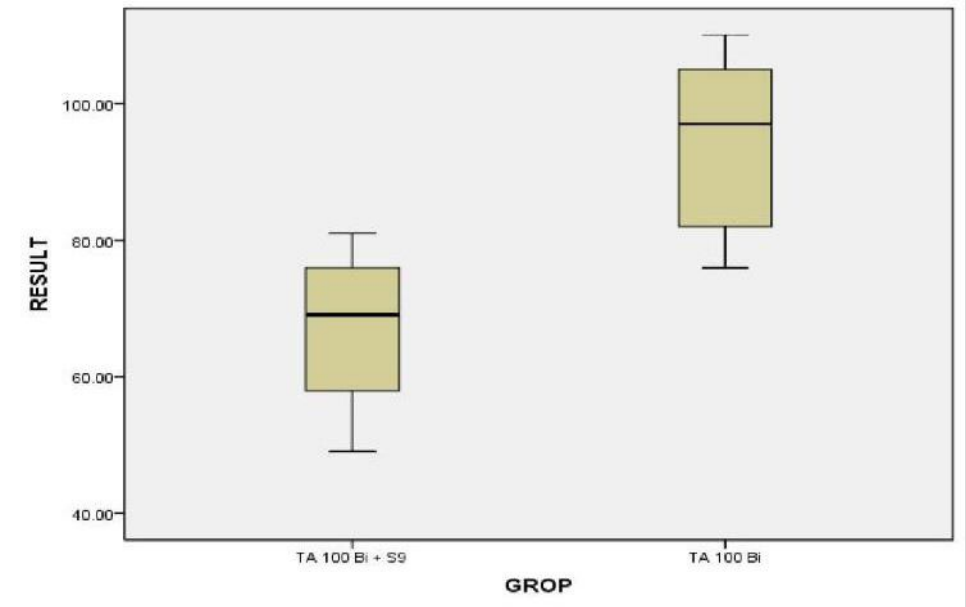
نتایج آزمایش با باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ نشان می دهد که با افزایش غلظت نانوذرات بیسموت تعداد کلنی های برگشتی افزایش می یابد. تعداد کلنی های برگشتی در کمترین غلظت ۸۴ و به ترتیب ۹۵ و ۱۰۴ می باشد که در مقایسه با تعداد کلنی های برگشتی شاهد منفی که ۷۶ می باشد، تقریباً برابر و یا کمی افزایش نشان می دهد و به دو برابر نرسیده است. پس نانو ذرات بیسموت در این غلظت ها اثرات جهش زایی ندارد. با محاسبه MR نیز نسبت موتاژنیسیته یا پتانسیل جهش زایی در سه نمونه مورد آزمایش به ترتیب ۱/۱ ، ۱/۲ ، ۱/۳ می باشد که هیچ یک مطابق فرمول به دو برابر نرسیده است. از طرف دیگر پتانسیل جهش زایی در شاهد مثبت ۵/۹ بوده است که از دو برابر بیشتر است و تاییدی بر سرطان زایی آزید سدیم می باشد. در مرحله دوم از آزمایش که درحضور S۹ میکروزوم کبد موش انجام شده است نتایج آزمایش نشان می دهد میانگین تعداد کلنی های برگشتی شاهد مثبت۴۰۸ می باشد که نشان دهنده سرطان زایی این ماده (آزید سدیم) است. میانگین تعداد کلنی های برگشتی شاهد منفی ۶۱ می باشد و تعداد کلنی های برگشتی نمونه مورد آزمایش در مقایسه با شاهد منفی اندکی افزایش دارد که دلیل بر عدم سرطان زایی نانوذرات بیسموت در غلظت های مورد استفاده می باشد. میزان MR یا پتانسیل موتاسیون زایی برای غلظت های مورد آزمایش به ترتیب ۱/۰۱، ۱/۰۹، ۱/۱ می باشد که مطابق فرمول محاسبه MR کمتر از ۲ برابر بوده و بنابر این هیچ کدام از غلظت های بکار رفته سرطان زا نمی باشد. در حالی که MR برای شاهد مثبت ۶/۶ بوده که دلیل بر سرطان زایی آزید سدیم می باشد(جدول ۲، نمودار۱و۲).

بحث و نتیجه گیری

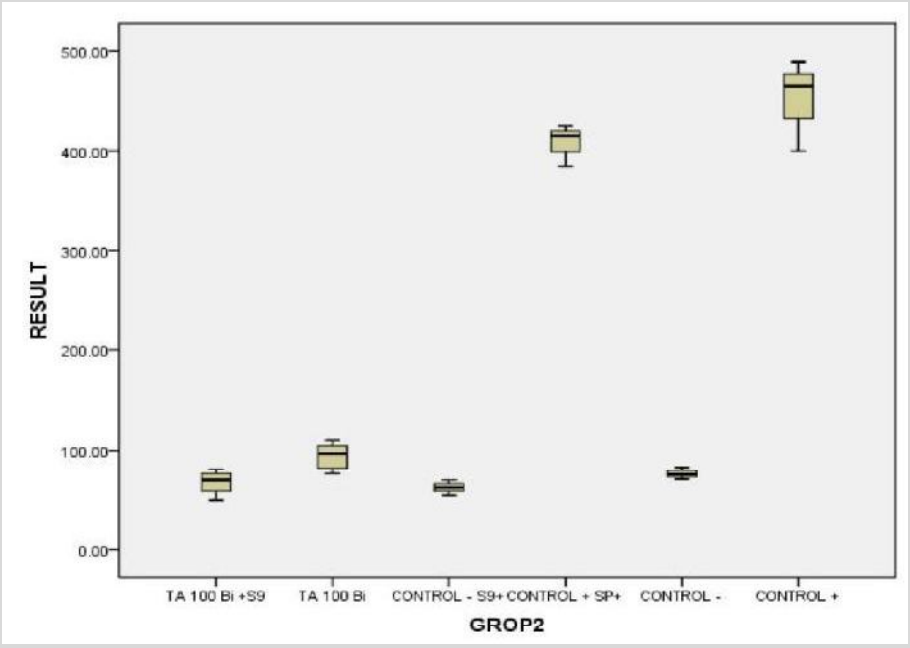
در قرن حاضر یکی از عوامل مرگ و میر در جوامع صنعتی و پیشرفته سرطان می باشد. در دو دهه گذشته انواع متفاوتی از مواد جهش زا و سرطان زای شیمیایی شناخته شده اند. امروزه دانشمندان بر این عقیده اند که آسیب ها و تغییرات ژنتیکی اعم از تغییرات تغییرات ایجاد شده در توالی و انسجام DNA بروز جهش یا موتاسیون در ژن ها ودیگر تغییرات ژنتیکی در ساختار کروموزومی در سرطان زایی نقش بسزایی دارند. از این جهت طراحی روش هایی برای مشخص نمودن سرطان زایی مواد بسیار با اهمیت می باشد. امروزه روش ایمز جهت غربالگری و شناسایی مواد جهش زا و ضد جهشی از روشهای متداول است (۱). کاربرد روش ایمز در این تحقیق به عنوان آزمونی استاندارد و دقیق جهت شناسایی جهش زایی نانو ذرات بیسموت می باشد.

جدول ۲- تعداد کلنی های برگشتی در حضور سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ و میکروزوم کبد موش (S۹)

	تعداد کلنی سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ (+S۹)	تعداد کلنی سالمونلا تیفی TA۱۰۰ موریوم (- S۹)
نمونه مورد آزمایش	میانگین تعداد کلنی برگشتی	میانگین تعداد کلنی برگشتی
کنترل مثبت	۴۰۸±۲۱/۳۷	۴۵۱±۶/۵۶
کنترل منفی	۶۱/۶۷±۷/۵	۷۶±۶/۵
بیسموت	۶۷±۱۱/۳۴	۹۴/۵۵±۱۲/۰۲



نمودار ۱- مقایسه میانگین کلنی های برگشتی نانو ذرات بیسموت در حضور سالمونلا تیفی موریوم و میکروزوم کبد موش



نمودار ۲- مقایسه میانگین کلنی های برگشتی نانوذرات بیسموت، کنترل مثبت و منفی در حضور سالمونلا تیفی موریوم و میکروزوم کبد موش (S9)

بررسی مقایسه ای که Mortelmans و همکارانش برروی روش های مختلف سنجش جهش زایی مواد شیمیایی انجام دادند، مشخص نمود که حدود۷۶-۷۱٪ از نتایج جهش زایی مواد شیمیایی با استفاده از سوش های مختلف جهش یافته سالمونلا در آزمون ها می باشد(۱۲). به دنبال نتایج حاصل از پژوهش‌هایWessner و همکارانش سوش های سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰،TA۹۷،TA۱۰۴ و نیز سوش *E.coli* K12 جهت سنجش جهش زایی و سرطان زایی برخی از مواد شیمیایی مناسب هستند.آن‌ها با بررسی بر روی نقش آنزیم‌های ویژه در فعال سازی کارسینوژن ها و نیز فعال سازی ظرفیت هایشان اهمیت بسیار زیادی دارند (۱۶، ۶). در این پژوهش، جهش یافتگی سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ با جدول پروفسور ایمز که در سال ۱۹۹۴

براساس آخرین تحقیقات ارائه داده شده است، همسویی نشان داده و سوش ها تایید شدند. برطبق نتایجی که ایمز و همکارانش با بررسی بر روی بیش از ۳۰۰ نوع ماده شیمیایی داشتند، این تئوری بیان گردید که در صورتی که تعدادکلنی ها برروی محیط کشت ۲ برابر شاهد منفی باشند ماده جهش زا محسوب می گردد. نتایج بدست آمده از این تحقیق با توجه به جدول با این تئوری همسویی و مطابقت داشت (۹). Wakabayashi و همکارانش عنوان نمودند ترکیبات مختلف را می توان براساس تعدا کلنی های برگشتی به ۴ گروه تقسیم کرد: جهش زای ضعیف (۵۰۰ کلنی برگشتی)، جهش زای متوسط (۲۵۰۰-۵۰۰ کلنی برگشتی)، جهش زای قوی (۵۰۰۰-۲۵۰۰ کلنی برگشتی) و جهش زای بسیار قوی (بیش از ۵۰۰۰ کلنی برگشتی) (۱۵). Green و Muriel در سال ۱۹۷۶، معادله زیر را برای محاسبه فرکانس موتاسیون (MR) ارئه نمودند(۸).

منابع

۱- امتیاز جو، م. ۱۳۸۶. بررسی اثرات جهش زایی و سرطان زایی سه ترکیب افزودنی به نفت خام میدان سیری (واقع در خلیج فارس) توسط باکتری سالمونلا تیفی موریوم . Ames test. علوم و تکنولوژی محیط زیست.

۲- مهرابیان، ص. ۱۳۸۳. بررسی اثر جهش زایی و سرطان زایی پلی اتیلن سنگین و سبک با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم۱۰۰ TA ۱۰۴،TA و میکروزوم. مجله علمی و پژوهشی حکیم.

3. Bathini, M., Goto, S., Tian, H., Ando, F., Fukuhara, M., Watanabe, I. (2002). Mutagenicity of 1,3-Butadiene, 1,4-Pentadiene -3- ol, Isoprene, 2,4-Hexadiene, cis and trans- piprylene, Envi- ron. Health Perspect, 3; 73-78.

4.Blackburn, G. R., Deitch, R. A., Schreiner, C. A., Mehlman, M. A., Mackerer, C. R. (1984). Estima- tion of the dermal carcinogenic activity of petro- leum fractions using a modified Ames assay. Cell Bio Toxicol, 1(1); 67-80.

5.Czygan, P. (1988). Microsomal metabolism of dimethyl hitrosamine and the cytochrome P450 dependency of its activation to a mutagen. Cancer Res, 33;2982-2986.

6. Dorothy, M., Ames, B. N. (1983). Revised meth- ods for the salmonella mutagenicity test. Mu- tat.Res, 113 ;173-216.

7.Fluckiger, S.I., Baumeister, M., Braun, K. (2004). Assessment of the performance of the Ames assay: a collaborative study with 19 coded compounds. Report of the International Collaborative Program, Progress in Mutation Research. Elsevier, 181-197.

8.Green, M., Muriel, W. (1976). Mutagen testing using Trp+ reversion in *Escherichia Coli* . Muta- tion Res, 38; 3-32.

9. Hekura, A., Shimada, H., Nakajima, M. (2005). Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study With 58 compounds. Oxford journals, 20; 217-228.

10. Kaplan, C., Diril, N., Sahin, S. (2007). Mutagenic potentials of dental cements as detected by the Salmonella/microsome test. Department of prosthodontics, 4019-4027.

11. Mccann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. (1975). Detection of carcinogens in the Salmo- nella/ microsome test. Assay of 300 chemicals. Proc.NatL.Acad.Sci.U.S.A, 72; 5135-5139.

12. Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames salmonella / microsome mutagenicity assay, Mutat .Res, 455; 29-60.

13. Hernandez- Delgadillo, R., Velasco-Arias, Diaz Katiushka, D. (2011). Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus* mutans growth and formation of biofilm. Available at: www. Ncbi .nlm.nih.gov /pubmed/ 22619547 .

14. Spingarn, N. E., Mccann, J., Kabori, J., Ames, B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R- factor plasmid , Proc.NatL.Acad.Sci.U.S.A, 7; 979-983.

15. Wakabayashi, K., Watanabe, T., Ohe, T. (2004). Mutagens in surface water: a review. Muta- sion Research, 567; 109-149 .

16. Wessner, D.R., Maiorano, P.C., Kenyon, J., Pillsbury, R., Campbell, A.M. (2000). Spot- over- lay Ames test of potential mutagens, See in- formation in: http://www.zoo.utoronto.ca/able, 1-16.