فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۷، جلد ۱۲، شماره ۴، پائیز ۹۸، صفحه ۴۹ تا ۵۹
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی اثر ضد سرطانی و ضد جهشی باکتری های پروبیوتیک(لاکتوباسیلوس کوآگولانس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA100 و میکروزوم کبدی موش

مریم اکرامی[۱]، **صدیقه مهرابیان**[۲]، رباب رفیعی طباطبایی[۳]
۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران
۲-استاد، میکروبیولوژی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.**mehrabians2012@yahoo.com**
۳-دانشیار، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان یکی از شایع ترین بیماری ها در دنیا می باشد، با توجه به افزایش ابتلا، جهت پیشگیری از این بیماری، استفاده از باکتری های پروبیوتیک حائز اهمیت می گردد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد سرطانی باکتری های پروبیوتیک توسط تست ایمز می باشد.

روش کار: در ابتدا، جهت شناسایی باکتری های پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق تست های مختلف بیوشیمیایی انجام گرفت، در مرحله بعد آزمون های تایید ژنوتیپ سوش سالمونلا تیفی موریوم TA100 اجرا شد. پس از تست های تاییدی، اثر ضد موتاسیونی سوپرناتانت کشت باکتری ها در مقابل عامل سرطان زای آزید سدیم توسط تست ایمز(سویه سالمونلا تیفی موریوم TA100) در حضور و عدم حضور S9 ارزیابی شد. نتایج حاصل از این آزمایش به کمک نرم افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بر اساس نتایج و مشاهده تعداد کلنی های برگشتی، فعالیت ضد موتاسیونی باکتری ها توسط تست ایمز تایید می گردد، بر این اساس آن ها می توانند عوامل سرطان زا را در رابطه باگونه باسیلوس کوآگولانس بدون حضورS9 تا بیش از ٤٥٪ و در حضور S9 بیش از ۵۰٪، هم چنین در گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز بدون حضورS9 بیش از ۵۰٪ و در حضور S9 بیش از ۵۵٪ مهار نمایند که نشان دهنده فعالیت ضدسرطانی بالایی می باشد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از محصولات حاوی باکتری های پروبیوتیک، دارای اثرات ضد موتاسیونی و ضد سرطانی می باشد. آن ها با تغییر فلور روده سبب کاهش جذب مواد سرطان زا و جهش زا شده و به سلامت انسان کمک می کنند. میزان اثر بازدارندگی بالاتر از ٤٠٪ نشان دهنده ی اثر ضد جهشی و ضد سرطانی قوی می باشد که بیان گر توانایی بالقوه این دونوع باکتری جهت جلوگیری از سرطان و جهش می باشد.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک ها، ضد سرطان، تست ایمز، سالمونلا تیفی موریوم TA100.

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(۳۶). 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(۲۸). 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(۲۸). سالمونلا باسیل گرم منفی، با ابعاد ۵ـ 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(۹). 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(۹). 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 (۶). 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(۲۸). 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 پلاسمید PkM ۱۰۱ 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 ای pAQ ۱ است که حامل ژن hisG428 بوده که یک ژن مقاوم به تتراسایکلین است. سویه های واجد پلاسمیدهای فوق را سویه های R-factor نامند (۳۴، ۲۸). 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(۱۹،۱۷، ۱۲، ۷، ۵، ۲، ۱). Ames و همکارانش ارتباط بین سرطان زایی و جهش زایی را حدود ۸۳٪ گزارش نمودند (۹۳). لاکتوباسیلوس ها فلور طبیعی دستگاه گوارش هستند که در تماس مستقیم با مواد موتاسیون زا قرار دارند. این باکتری ها در درمان و پیشگیری از بیماری های گوارشی نقش مهمی ایفا می کنند(۲۳). اکثر لاکتوباسیل ها در خانواده لاکتوباسیلاسه و جنس لاکتوباسیلوس طبقه بندی شده اند. آن ها باسیل های گرم مثبت، کاتالاز منفی، فاقد اسپور و تقریباً ۵۶ گونه از این جنس تاکنون شناسایی شده است(۸). باسیلوس کوآگولانس دارای اسپور بوده و در برابر اسید معده و گرما مقاوم می باشد، در نتیجه می-توان از این باکتری پروبیوتیکی در تولید انواع خوراکی مانند نان، بیسکوییت و غیره استفاده نمود که در تولیدشان نیاز به گرمای زیادی است و پس از استفاده به علت وجود اسپور در برابر اسید معده مقاوم است. نتایج تحقیقات انجام شده نشان می دهد استفاده از باکتری های پروبیوتیک در کاهش خطر سرطان موثر است. هدف کلی و کاربردی این تحقیق بررسی اثر ضد سرطانی و ضد جهشی سوپرناتانت باسیلوس کوآگولانز و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقابل ماده سرطان زا با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA100 و میکروزوم کبدی موش می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت تجربی در سال ۱۳۹۷ انجام شد. طی این بررسی، باکتری های مورد نظر از کلکسیون میکروبی انستیتو پاستور ایران و قرص های پروبیوتیکی با عنوان Biodiab تهیه گردید و به کمک روش های بیوشیمیایی شناسایی شدند. برای جداسازی و شناسایی باکتری های پروبیوتیک طبق کتاب The Prokaryotes، ابتدا باکتری های اسیدلاکتیک را در محیط کشت آگار MRS کشت داده و در انکوباتورCO2 دار در دمای ۳۷ و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شدند. سپس با رنگ آمیزی گرم، مشاهده میکروسکوپی، تست کاتالاز، تست مقاومت به اسید، تست حساسیت به آنتی بیوتیک و انجام تست تخمیر قندهای(گلوکز، لاکتوز، مانیتول، سوربیتول، سوکروز، زایلوز، آرابینوز، رافینوز، فروکتوز، گالاکتووز) مورد تأیید قرار گرفتند(۷).

این تحقیق به روش آزمایشگاهی انجام شد. سویه باکتری در این پژوهش، سوش TA ۱۰۰ مورد تایید قرار گرفت و نتیجه کار با این سوش دنبال شد(۲۸، ۹). 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 (۲۸، ۹). آزمون های تایید ژنوتیپ سوشTA۱۰۰، 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 تهیهS۹، 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(۲۷).

آزمون جهش زایی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم۱۰۰TA

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 سوش۱۰۰TA 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 شبانه۱۰۰TA 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(۲۸، ۹). 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(۲۸، ۹)

آزمون سرطان زایی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم ۱۰۰TA و میکروزوم کبد موشS۹

در این آزمون علاوه بر افزودن ۰/۱ میلی لیتر کشت تازه شبانه سالمونلا تیفی موریوم ۱۰۰TA، 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 (۲۵، ۹).

باکتری های پروبیوتیکی خالص شده(لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس کوآگولانس) در محیط MRS Broth تلقیح شدند تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند($۱/۵\times۱۰^{۸}$cfu/ml) به دست آید. سپس محیط در شرایط بی هوازی و در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. برای تهیه سوپرناتانت کشت، باکتری ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴درجه سانتی گراد با دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ شدند، و از مایع رویی کشت برای انجام ادامه کار استفاده گردید.

محاسبه درصد بازدارندگی از فرمول ong و همکارانش

در صورتی که جهش زایی آزید سدیم در کنترل مثبت ۱۰۰٪ در نظر گرفته شود، درصد بازدارندگی نمونه های آزمایشی طبق فرمول زیر قابل محاسبه است :

$$S=[1-T/M]\times100$$

این فرمول در سال ۱۹۸۶ توسط brockman ، stwart ، mong، ong ارائه شد که در آن S مقدار درصد بازدارندگی از جهش، T تعداد کلنی های برگشتی در هر پلیت در حضور ماده جهش زا و در نهایت M تعداد کلنی های برگشتی در هر یک از پلیت های کنترل مثبت می باشد(۲۹). لازم به ذکر است که تعداد کلنی های برگشتی خود به خودی در کنترل منفی باید از صورت و مخرج کسر کاسته شود. براساس تحقیقاتong، هنگامی که درصد بازدارندگی بین ۲۵-۴۰ درصد به دست آید، اثر ضد سرطانی نمونه متوسط تلقی می شود و مادامی که درصد بازدارندگی بیش از ۴۰ درصد باشد اثر ضد سرطانی نمونه قوی است و در صورتی که کمتر از۲۵ درصد باشد اثر ضد جهشی نمونه ضعیف است.

تحلیل آماری

در این تحقیق، نتایج با توجه به تعداد کلنی های برگشتی در نمونه اصلی و شاهد مثبت و منفی،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 این بررسی طبق تست های شناسایی و تاییدی کتاب The Prokaryotes و برجی، هم‌چنین تست های حساسیت به آنتی بیوتیک، دو نمونه باکتری شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس کوآگولانس شناسایی و جداسازی شدند(جدول شماره ۱ و ۲).

جدول ۱-شناسایی سویه های پروبیوتیکی بر اساس تست های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی

شماره	گونه های پروبیوتیکی	کاتالاز	حرکت	اکسیداز	تخمیر کربوهیدرات			
					گلوکز	سوکروز	مانیتول	تره هالوز
۱	باسیلوس کوآگولانس	+	+	+	+	+	+	+
۲	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	–	–	–	+	+	–	–

جدول ۲- شناسایی سویه های پروبیوتیکی بر اساس حساسیت به آنتی بیوتیک ها

شماره	گونه های پروبیوتیکی	آنتی بیوتیک ها					
۱	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	Gentamicin	Ampicillin	Penicillin	Vancomycin	Tobramycin	Erythromycin
۲	میزان حساسیت	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم
۳	باسیلوس کوآگولانس	Chloramphenicol	kanamycin	Amoxycillin	Ciprofloxacin	Norfloxacin	Gentamycin
٤	میزان حساسیت	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس

در تایید سوش سالمونلا تیفی موریوم TA100 از نظر جهش زایی، وجود هاله شفاف اطراف دیسک نشان گر عدم رشد سلول ها و وجود جهش Rfa بود. این جهش سبب کاهش نسبی سد لیپوپلی ساکارید شده و سطح باکتری را می پوشاند و قابلیت نفوذ مولکول های بزرگ را افزایش می دهد. هم چنین عدم تشکیل هاله در اطراف دیسک، وجود پلاسمید R-factor را در این باکتری به اثبات می رساند. از طرفی، عدم رشد در ناحیه پرتو دیده، نشان دهنده جهش UVrB می باشد؛ در نتیجه، سوش مذکور با جدول ایمز هم سویی دارد و بنابراین مورد تایید قرار می گیرد(جدول ۳).

اثر ضدجهش زایی و ضد سرطانی سوپرناتانت(مایع رویی کشت) باکتری های پروبیوتیکی روی ماده جهش زای سدیم آزید با وجود باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100 درحضور و عدم حضور عصاره میکروزوم کبدی(S9) در جدول ۴ آورده شده است. این جداول نشان دهنده درصد مهار این باکتری ها از ۰-۱۰۰٪ می باشد. سویه های پروبیوتیکی توانستند در حضور عصاره میکروزوم کبدی(S9) ماده جهش زای سدیم آزید را بیش از ۵۰٪ مهار کنند که نشان از اثر ضد سرطانی بودن این باکتری ها می باشد. هم چنین این سویه ها در عدم حضور عصاره نیز اثر مهارکنندگی بالایی از خود نشان دادند که توانایی آن ها را در آنتی موتاسیون بودن به اثبات می رساند.

جدول ۳- مشخصات ژنوتیپی سالمونلا تیفی موریوم TA100 طبق جدول ایمز

تست باکتری	جهش Rfa	جهشUVRB	جهش R-factor
سالمونلا تیفی موریوم TA100	+	+	+

جدول ٤- تعداد کلنی های برگشتی اثر ضد جهشی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس کوآگولانس در حضور و عدم حضور سالمونلا تیفی موریوم۱۰۰TA و میکروزوم کبد موش (S۹)

	تعداد کلنی سالمونلا تیفی موریوم ۱۰۰TA (+S۹)		تعداد کلنی سالمونلا تیفی۱۰۰TA موریوم (- S۹)	
نمونه مورد آزمایش	میانگین تعداد کلنی برگشتی	درصد بازدارندگی	میانگین تعداد کلنی برگشتی	درصد بازدارندگی
کنترل مثبت	۵۲٤±۲۱/۳۷	--	٤٥۱±٦/٥٦	-
کنترل منفی	۸٦±۷/٥	-	۷٦±٦/٥	-
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۲٦۳±۱۱/۳٤	٦۱	۳۱۳±۱۲/۰۲	٪٥۳
باسیلوس کوآگولانس	۲۸۷±۷/٥	٥٥	۳۲۳±۱۱/۳٤	٪٥۱

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). در طی چند دهه گذشته، وجود میکروارگانیسم های پروبیوتیک در انواع مختلف مواد غذایی به خصوص فرآورده های لبنی در حال افزایش بوده است. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس کوآگولانس جزء باکتری های پروبیوتیک محسوب شده و هر دو فلور طبیعی روده هستند که اثرات مفید بسیاری روی انسان ها دارند(۳۳). ۸۵٪ سرطان ها در اثر جهش های ژنتیکی به وجود می آیند بنابراین می توان نتیجه گرفت بیشتر ترکیبات جهش زا به احتمال زیاد سبب سرطان می شوند. امروزه استفاده از روش ایمز جهت شناسایی مواد جهش زا رایج است که روشی به مراتب ارزان تر از سایر روش ها می باشد. اکثر سویه های مورد استفاده درتست ایمز گالاکتوز منفی بوده و باعث اختلال در اپران گالاکتوز دخیل در سنتز لیپوپلی ساکارید سطح باکتری، در بیماری زایی دچار نقص هستند. به طور کلی، مکانیسم هایی که باکتری های پروبیوتیک برای کاهش مولد موتاسیون زا و سرطان زا به کار می گیرند کاملاً شناخته شده نیست(۲۰). اما برخی از آن ها عبارتند از:

۱-اتصال به ماده موتاسیون زا و جلوگیری از جذب آنها توسط بدن و تجزیه برخی ترکیبات موتاسیون زا: El-Nezami در بررسی خود به این نتیجه رسید که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط In-Vitro توانایی اتصال به آفلاتوکسین را دارد(۱۱). هم‌چنین لاکتوباسیلوس ها توانایی تجزیه ترکیبات N-نیتروزآمین موجود در مواد غذایی که از عوامل مهم ایجاد سرطان محسوب می شوند، را نیز دارد(۳۰).

۲- کاهش فعالیت برخی آنزیم های مضر و مهار باکتری-های مضر روده: آنزیم های مدفوعی مانند نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز، بتا-گلوکورونیداز، گلیکولیک اسید

هیدرولاز قادرند ترکیبات پیش جهش زا و پیش سرطان-زا را به ترکیبات جهش زا و سرطان زا تبدیل کنند. این آنزیم ها توسط باکتری های مضر روده تولید می شوند و ثابت شده است که کاهش این آنزیم های مضر که رابطه مستقیمی با کاهش باکتری های مضر دارد، ریسک ابتلا به سرطان را کاهش می دهد. در بررسی Goldin و همکارانش، گزارش هایی حاکی از توانایی باکتری های پروبیوتیک در کاهش فعالیت سه آنزیم مضر بتاگلوکونیداز، نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز به دست آمد(۳۱، ۱۵).

۳- تولید متابولیت های ویژه و کاهش اسیدهای صفراوی: باکتری های پروبیوتیک برخی از متابولیت ها مانند بوتیرات، فولات وغیره تولید می کنند که با اثر روی سلول های اپی تلیال روده، تکثیر سلول های سرطانی را کاهش می دهند. Biffi و همکارانش، در مطالعه خود نشان دادند که تولید متابولیت ها توسط باکتری های پروبیوتیک با جلوگیری از تکثیر سلول های سرطانی ارتباط دارد(۴).

٤- تحریک سیستم ایمنی: سلول های باکتری های پروبیوتیک قادرند سبب تحریک و تقویت سیستم ایمنی و افزایش میزان سیتوکین شوند، هم چنین عاملی ممانعت کننده از رشد تومور و کاهش سرطان می باشند(۲۶). Sekine و همکارانش در بررسی خود، اثرات مثبت را در تحریک سیستم ایمنی موش ها در مهار مواد موتاسیون زا نشان دادند(۳۲). هم چنین تحقیقات انجام شده، نقش مثبت باکتری های پروبیوتیکی را دذ کاهش عوامل جهش زا تایید می کنند. در مطالعه Chalova و همکارانش، توانایی سوپرناتانت(مایع رویی کشت) برخی باکتری های پروبیوتیک اعم از لاکتوباسیلوس ها در فازهای مختلف رشد در کاهش دو ماده موتاسیون زای بنزوپیرن و سدیم آزید بررسی شد که اثرات مناسبی در کاهش این مواد توسط سوپرناتانت باکتری ها مشاهده گردید(۱۶). در مطالعه حاضر نیز سویه های پروبیوتیکی مورد بررسی، توانایی خوب ضد جهشی از خود نشان دادند. در بررسی Zobel و همکارانش، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و عصاره کشت این باکتری مانع از آسیب DNA توسط MNNG(یک ماده سرطان زا)گردید(۱۸). باسیلوس کواگولانس در میان باکتری‌های پروبیوتیک یک باکتری خاص است زیرا دارای اسپور می باشد که این ویژگی باعث می شود که این باکتری بتواند شرایط pH معده و روده را تحمل کند و رشد و تزاید نیز داشته باشد. این باکتری با ایجاد تغییر در محیط روده می تواند باکتری های مفید و ضروری روده را حمایت کند و با بهبود وضع محیط و با جایگزین شدن میکروارگانیسم های مطلوب و ضروری و هم‌چنین با خاصیت آنتاگونیستی، نسبت به باکتری های بیماری زا بخشی از فعالیت خود را به عنوان یک پروبیوتیک انجام دهد. در نتیجه، در شرایط In-Vitro توانایی ضدجهشی سویه های پروبیوتیکی با مطالعه حاضر مطابقت داشت.

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(۲۸). به دنبال نتایج حاصل از پژوهش‌های Wessner 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(۳۶، ۹). 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(۱۷). 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)(۳۵). Green و Muriel در سال ۱۹۷۶، معادله زیر را برای محاسبه فرکانس موتاسیون (MR) ارئه نمودند(۱۳). به طور کلی نتایج نشان داد که متابولیت های تولیدی جدا شده توسط باکتری های پروبیوتیک(لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس کواگولانس) قادرند اثرات ضد سرطانی و ضد جهشی داشته باشند، بنابراین می توان بیان نمود که این باکتری ها می توانند به سلامت انسان کمک شایانی کنند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی افرادی که در مراحل انجام این پژوهش همکاری داشته اند، تشکر و قدردانی می گردد.

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،TA 104 و میکروزوم. مجله علمی و پژوهشی حکیم.

3.Ames, BN., MC.Cann, J., Yamasaki, E. (1976). Method for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalin mutagenicity test. Mutant Res, 31(6); 347-349.

4.Biffi, A., Coradini, D., Larsen, R. L., Di Fronzo, G.(1997). Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. Nutr Cancer, 28(1); 98.99.

5.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.

6.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.

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

8. De Roo, NM., Katan, M. (2000). Effects of probiotic bacteria on human. Am J Clin Nutr, 71; 405-411 .

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

10. Dworkin , M., Falkow, S., Rosenbeg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E., Editors. (2006). The prokaryotes: a handbook on the biology of baceria. 3rd ed. Newyork: SPRINGER; p.320-404.

11. El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salmines, S., Ahokas, J. (1998). Physico chemical alteratations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. J Food Prot., (4); 466-468.

12. 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 collab- orative program, progress in mutation research. Elsevier, 181-197.

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

14. Gomes-cameiro, MR., Daniela, MMD. (2005). Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of alpha bisabolol in the Salmonella/microsome assay. Mutat Res, 585(1-2); 105-12.

15. Golden, BR., Gorbach, SL.(1984). The effect of milk and lactobacillus on human intestinal bacterial enzyme activity. Am J Clin Nutr, 39(5); 756-761.

16. Halvo, VI., Lingbeck, JM., Kwon, ym., Ricke, SC. (2008). Extracellular antimutagenic activities of selective probiotic Bifidobacterium and Lactobacillus spp. As a function of growth phase. J Environ Sci Health B., 43(2); 193-198.

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

18. Heni- Dong, P., Chang – Ho, R. (2001). Antimutagenic activity of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from kim chi korean fermented vegetables. Biotechnology Letters, 23(19); 1588-1589.

19. 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.

20. Hirayama, K., Raftar, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbe Infect., 2(6); 687-68.

21. Horn, RC., Vargas, VM. (2003). antimutagenic activity of extracts of natural sub stances in the salmonella/microsome assay. Mutagenesis, 18(2); 113-18.

22. Kaplan, C., Diril, N., Sahin, S. (2007). Mu-tagenic potentials of dental cements as detected by the Salmonella/microsome test. Department of Prosthodontics, 4019-4027.

23. Lo, PR., Yu, RC., Chou, CC., Huang, EC. (2004). Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifido bacteria under acidic and bile conditions against benzo[a] pyrene by a modified ames test. Int J Food Microbial, 93(2); 249-257.

24. Namiki, M. (1990).Antioxidants/antimutagenes in foods.Crit Rev Food Sci Nutr , 29(14); 273-300.

25. Maron, DM., Ames, BN.(1983). Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mutat Res, 113(3-4); 173-215.

26. Matsuzaki, T.(1998). Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain shirota. Int J Food Microbial, 41(2); 133-140.

27. 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 .

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

29. Ong, TM., Wong, WZ., Stwart, J., Brockman, HE. (1986). Chlorophyll in a potent anti mutagen againt environmental and dietary complex mixture. Mutat Res, 173(2); 111-15.

30. Rowland, IR., Grass, P. (1975). Degradation of N-nitrosamines by Intestinal Bacteria. APPL Microbiol, 29(1); 7-12.

31. Saarela, M., Mogen Sen, G., Fonden, R., Matt, OJ., Mattila- Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safty, functional and technological properties. J Biotechnol, 84(3); 197-215.

32. Sekine, K., Toida, T., Saito, M., Kuboyama, M., Kawashima, T, Hashimoto, Y. (1985). A new morphologically characterized cell wall preparation(whole peptidoglycan) from bifidobacterium in fantis wih a higher efficacy on the regression of an stablished tumor mice. Cancer Res, 45(3); 1300-1307.

33. Shah, NP. (2000). Survival in dairy foods. Journal of Dairy Sience, 83(4); 894-907.

34. 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.

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

36. 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.

Investigation about the Mutagenic and Carcinogenic Effects of Probiotice Bacteria with Using *Salmonella typhimurium* TA100 and Rat Liver Microsomes(S9)

M.Ekrami[1]., **S. Mehrabian[2]**., R. Rafiei Tabatabei[3]

1.Msc Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran. Iran.

2. Professor, Department of Microbiology, Kharazmi University, Tehran. Iran. **mehrabians2012@yahoo.com**

3. Associate Professor Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran. Iran.

Received:2018. 17. 8 **Accepted: 2019.22.10**

Abstract

Inroduction & Objective: Probiotic bacteria is potential hazards should also be considered and used at concentrations that have not mutagenic or carcinogenic effects. This study aimed to assess Investigation about the Mutagenic and Carcinogenic Effects of Probiotice Bacteria with Using *Salmonella typhimurium* TA100 and Rat Liver Microsomes(S9).

Material and Methods: In this study, we utilize the Ames test using *Salmonella typhimurium* TA100. Firstly, the purity of the strains was confirmed in terms of purity of mutagenic properties. In the next phase of this research the rat liver micrsomes was separately added to the minimal glucose agar medium containing the suspected carcinogenic, and probiotice bacteria negative and positive controls and all back colonies were counted.

Results: The number of revertant colonies the treated plates with S9 is decreased and it means mutagenic and carcinogenic effect of probiotice bacteria with S9 is decreased.

Conclusion: The results of the present study shows that the probiotice bacteria at concentrations examined had no mutagenic and carcinogenic effect.

Keywords: Probiotice Bacteria, *Salmonella typhimurium* 100, Ames Test, Microsomes.