

فعالیت ضد موتاسیونی سویه‌های پروبیوتیکی جدا شده از محصولات پروبیوتیکی

رضا کاظمی درسکی^۱، ناصر قائمی^۲، میرسان میرپور^۳، فاطمه میرداوودی^۴

^۱ کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

^۲ استادیار بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۳ مربی میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

^۴ کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های پروبیوتیک، مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق حفظ تعادل میکروبی روده تأثیرات سودمندی بر سلامت انسانها دارند. براساس تحقیقات انجام شده، استفاده از محصولات پروبیوتیک در کاهش خطر سرطان مؤثر است. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضد موتاسیونی باکتری‌های پروبیوتیک جدا شده از ماست و قرص پروبیوتیکی بر عوامل جهش‌زا و سرطان‌زا می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، باکتری‌های پروبیوتیک از ماست و قرص پروبیوتیکی در محیط MRS در شرایط بی‌هوازی (۵٪ دی‌اکسید کربن و گاز پک) و در دمای ۳۷°C جدا سازی شدند. سپس با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و مورد تأیید قرار گرفتند. در ادامه، اثر ضد موتاسیونی سوپرناتانت کشت آنها در مقابل عوامل موتاسیون‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم توسط تست ایمز (سویه سالمونلا تیفی موریوم TA100) در حضور و عدم حضور S₉ ارزیابی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از ماست و قرص پروبیوتیکی، ۶ باکتری پروبیوتیک جدا شد. نتایج فعالیت ضد موتاسیونی باکتری‌ها توسط تست ایمز نشان داد آنها می‌توانند عوامل موتاسیون‌زا را در برخی گونه‌ها تا بیش از ۴۰٪ مهار کنند که فعالیت ضد موتاسیونی خوبی محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از محصولات حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، دارای اثرات ضد موتاسیونی و ضد سرطانی بسیار خوبی می‌باشد. آنها با تغییر فلور روده سبب کاهش جذب مواد سرطان‌زا و جهش‌زا شده و به سلامت انسان کمک می‌کنند.

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک‌ها؛ عوامل آنتی‌موتاسیونیک؛ تست ایمز؛ ضد موتاسیونی.

نویسنده مسئول مکاتبات: باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: reza_kazemi_d@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸

مقدمه

هستند که در تماس مستقیم با مواد موتاسیون‌زا قرار دارند. این باکتری‌ها در درمان و پیشگیری از بیماری‌های گوارشی نقش مهمی ایفا می‌کنند (۴). لاکتوباسیلوس‌های گرم مثبت فاقد اسپور، کاتالاز منفی و متعلق به خانواده *Lactobacillaceae* می‌باشند و تقریباً ۵۶ گونه از این جنس تاکنون شناسایی شده است (۵). جنس *بیفیدوباکتریوم* از فراوان‌ترین گونه‌هایی است که فلور طبیعی روده بزرگ انسان را تشکیل می‌دهد. این جنس دارای ۳۰ گونه بوده که ۱۴ گونه آن منبع انسانی دارند (۶). آزمایشهای

سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جوامع به شمار می‌رود و عوامل متعدد شیمیایی، پرتوی، ویروسی و توارث در آن نقش دارد (۱). آلودگی مواد غذایی و محیط، از مهم‌ترین مشکلات بشر و عامل بیماری‌های عمده‌ای از جمله سرطان است (۲). هر عملی که سبب حذف، مهار و غیرفعال‌سازی مواد موتاسیون‌زای ایجاد کننده سرطان شود، ارزشمند است (۳). لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها فلور طبیعی دستگاه گوارش

(۵٪ دی‌اکسید کربن و گاز پک) در دمای 37°C برای ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و کلنی‌های خالص‌سازی‌شده؛ با تست‌های بیوشیمیایی، تخمیر قندها، مطالعات میکروسکوپی، رشد در دمای 45°C ، ۳۷، ۱۵ و تولید آمونیاک از آرژنین، تا سطح گونه شناسایی و طبق کتاب The Prokaryotes و بر جی مورد تأیید قرار گرفتند (۱۱). در این مطالعه از باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* استفاده شد. این باکتری در اپرون هیستدین خود دارای جهش بوده و در کنار جهش‌های ثانویه دیگر، توانایی بالایی در تشخیص عوامل جهش‌زا دارد.

جهش‌های ثانویه و چگونگی تأیید آنها به قرار زیر است:

وابستگی به هیستدین: سویه *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* در محیط نوترینت براث کشت شبانه داده شد (به میزان ۰/۵ مک‌فارلند) و به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری گردید. برای انجام تست، ۰/۱ ml از باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* کشت داده‌شده در نوترینت براث به محیط حداقل گلوکز (Minimal Glucose Agar) حاوی ۰/۱ ml محلول هیستدین و بیوتین اضافه شد. برای کنترل نیز ۰/۱ ml از باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* در محیط حداقل گلوکز حاوی ۰/۱ ml بیوتین شده (محیط حداقل دارای بیوتین و فاقد هیستدین) و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری شدند.

جهش Rfa: در این آزمون ۰/۱ ml از کشت شبانه باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* در محیط نوترینت براث به ۲ ml تاپ آگار اضافه شد، و در ادامه پس از یک دقیقه تکان دادن روی محیط نوترینت آگار، پخش گردید. بعد از بسته شدن، دیسک آغشته به کریستال ویوله ۰/۱٪ روی محیط نوترینت آگار حاوی باکتری قرار گرفت و به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری شد.

جهش Uvr B: از این آزمون برای تأیید حساسیت UV در سوش *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* استفاده می‌شود. ۰/۱ ml از کشت شبانه باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* در محیط نوترینت براث، در محیط نوترینت آگار کشت داده شد و تنها نیمی از پلیت توسط کاغذ آلومینیومی پوشانده گردید. سپس در فاصله ۳۳ cm از لامپ UV، به مدت ۸ ثانیه پرتو دهی شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری گردید.

ضد جهشی و ضد سرطانی روی حیوانات حساس آزمایشگاهی پرهزینه و وقت گیر است، به همین دلیل می‌توان از روش‌هایی مانند تست ایمز برای تعیین پتانسیل ضد جهشی و ضد سرطانی مواد استفاده کرد (۷). خاصیت منحصر به فرد این آزمون استفاده از میکروزوم کبد (S_9) برای فعال‌سازی برخی مواد جهش‌زا و سرطان‌زا است. این عصاره میکروزومی از کبد پستاندارانی مثل رت تهیه می‌شود (۸). نتایج تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در کاهش خطر سرطان مؤثر است. عصاره شیر تخمیر شده با *لاکتوباسیلوس بولگاریس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* دارای خاصیت ضد جهش‌زایی روی اتیل متیل سولفانات و متیل متان سولفانات می‌باشد (۹). همچنین بیفیدوباکتریوم‌های موجود در دستگاه گوارش، اثرات خوبی در مهار ماده قوی جهش‌زای بنزوپیرن از خود نشان می‌دهند (۴). مطالعات روی مدل‌های آزمایشگاهی نشان داده است، باکتری‌های اسید لاکتیک دارای اثرات مهار کنندگی روی گسترش زخم‌های پیش سرطانی و تومور در مدل حیوانی هستند (۱۰). این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد جهشی سوپرناتانت (مایع رویی کشت) *لاکتوباسیلوس* ها و بیفیدوباکتریوم‌های جدا شده از ماست و قرص پروبیوتیکی در مقابل مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم با استفاده از تست ایمز و سویه *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* در حضور و عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9) صورت گرفت.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی در سال ۱۳۸۹ انجام شد. طی این بررسی از نمونه‌های ماست پروبیوتیکی رایج در سوپرمارکت‌ها و کپسول تجاری پروبیوتیک ساخت شرکت نچرال فاکتورز کانادا برای جداسازی گونه‌های پروبیوتیکی موجود در آنها استفاده گردید که تنها گونه‌های متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* و جنس بیفیدوباکتریوم مدنظر قرار گرفت.

برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک، از نمونه ماست پروبیوتیکی و کپسول تجاری پروبیوتیک ساخت شرکت نچرال فاکتورز کانادا رقت تهیه گردید و به روش پورپلیت در محیط MRS Agar کشت داده شد، سپس در شرایط بی‌هوازی

تغییر یافته آن در سال ۲۰۰۵ (۱۳)، در حضور و عدم حضور عصاره کبد (S₉) انجام شد.

۱- حضور عصاره میکروزوم کبد (S₉)

نمونه اصلی: ۰/۱ ml از مایع رویی کشت (سوپرناتانت) باکتری پروبیوتیکی جدا شده از قرص و ماست پروبیوتیکی، ۰/۱ ml کشت تازه و شبانه سالمونلا تیفی موریوم TA100 در محیط نوترینت براث، ۰/۱ ml از مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم به میزان ۱/۵ μg در هر پلیت ماده جهش‌زا، به‌طور جداگانه به لوله محتوی ۳ ml تاپ آگار افزوده شد. برای انجام چرخه سلولی، ۰/۱ ml از محلول ۰/۵ mM هیستدین و بیوتین نیز به لوله اضافه گردید، در پایان با افزودن ۰/۵ ml از عصاره میکروزوم کبد (S₉) به تاپ آگار، و بعد از ۳ دقیقه تکان دادن، به‌صورت یکنواخت بر روی محیط حداقل گلوکز (Minimal Glucose Agar) پخش گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد.

شاهد مثبت: ۰/۱ ml کشت تازه و شبانه سالمونلا تیفی موریوم TA100 در محیط نوترینت براث، ۰/۱ ml از مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم به میزان ۱/۵ μg در هر پلیت ماده جهش‌زا به‌طور جداگانه، ۰/۱ ml از محلول ۰/۵ mM هیستدین، بیوتین و ۰/۵ ml از عصاره میکروزوم کبد (S₉) به ۳ ml تاپ آگار اضافه شد، در ادامه بعد از ۳ دقیقه تکان دادن، به‌صورت یکنواخت بر روی محیط حداقل گلوکز پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد.

شاهد منفی: ۰/۱ ml کشت تازه و شبانه سالمونلا تیفی موریوم TA100 در محیط نوترینت براث، ۰/۱ ml DMSO، ۰/۱ ml از محلول ۰/۵ mM هیستدین، بیوتین و ۰/۵ ml از عصاره میکروزوم کبد (S₉) به ۳ ml تاپ آگار اضافه شد. در ادامه، بعد از ۳ دقیقه تکان دادن، به‌صورت یکنواخت بر روی محیط حداقل گلوکز پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد.

۲- عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (S₉)

این قسمت نیز مانند مراحل شرح داده شده قبلی است، با این تفاوت که در این مرحله به محیط‌ها عصاره میکروزوم کبد (S₉) اضافه نمی‌شود.

آزمون R-Factor: این آزمون برای بررسی وجود فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین به کار می‌رود. در این آزمون از دیسک آمپی‌سیلین استفاده می‌شود. برای انجام این تست، ۰/۱ ml از کشت شبانه باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100 موجود در محیط نوترینت براث، در محیط نوترینت آگار کشت داده شد و دیسک آمپی‌سیلین روی محیط نوترینت آگار حاوی باکتری قرار گرفت، سپس به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. طیف وسیعی از عوامل سرطان‌زا و جهش‌زا نیاز به فعال‌سازی متابولیکی برای شناسایی دارند. برای تهیه عصاره میکروزوم (S₉)، موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت دور از آب و غذا نگهداری شدند تا ترشح آنزیم‌های کبدی به‌واسطه گرسنگی تحریک شوند و افزایش یابند. در ادامه، پس از کشتن حیوان، با وسایل کاملاً استریل کبدها با دقت خارج و با کلرید پتاسیم سرد و تازه ۰/۱۵ M شستشو داده شدند تا گلبول‌های قرمز که مانع از فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم P450 می‌شوند خارج گردند. به ازای وزن هر گرم کبد، ۱ cc کلرید پتاسیم ۰/۱۵ M به کبدها اضافه شده و با قیچی استریل روی یخ له و خرد شدند. سپس کبدها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C با دور ۹۰۰۰ سانتریفوژ شدند. برای آماده‌سازی مواد موتاسیون‌زا، ۰/۱۵ g از هر ماده موتاسیون‌زا در ۱۰ cc دی‌متیل سولفاکساید (DMSO) حل شد، سپس ۱ cc از این محلول در ۹ cc DMSO دیگر حل شده و بدین ترتیب ۱/۵ ml/μg از هر ماده موتاسیون‌زا به دست آمد. باکتری‌های پروبیوتیکی خالص شده (لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها) در محیط MRS Broth تلقیح شدند تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (۱/۵ × ۱۰^۸ cfu/ml) به دست آید. سپس محیط‌ها در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. برای تهیه سوپرناتانت کشت، باکتری‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴°C با دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ شدند، و از مایع رویی کشت برای انجام ادامه کار استفاده گردید.

برای آزمون ضد جهشی و ضد سرطان‌زایی، بررسی توسط سه پلیت (پلیت اصلی شامل باکتری پروبیوتیکی در کنار دو شاهد مثبت و منفی) به‌طور همزمان انجام می‌شود و شمارش کلنی‌های برگشتی پلیت‌ها و مقایسه آنها نشان‌دهنده جواب آزمون است. این مطالعه براساس آزمون شرح داده شده توسط ایمز (۱۲) و آزمون

برای محاسبه درصد بازدارندگی از فرمول ong و همکارانش:

$$(\times 100) = \frac{[A-B]}{A}$$

که در سال ۱۹۸۶ ارائه شد استفاده گردید. در این فرمول، B تعداد کلنی برگشتی در هر پلیت در حضور ماده جهش‌زا و باکتری مورد بررسی و A تعداد کلنی برگشتی در پلیت کنترل مثبت است (۱۴). اگر میزان مهارکنندگی باکتری‌ها کمتر از ۲۵٪ باشد اثرات ضد جهشی و بازدارندگی منفی است، اما اگر میزان مهارکنندگی بین ۲۵-۴۰٪ باشد اثرات ضد جهش‌زایی متوسط خواهد بود و در صورتی که اثرات مهارکنندگی مواد جهش‌زا بالای ۴۰٪ باشد اثرات مهارکنندگی و ضد جهشی نیز بالا خواهد بود. نتایج با

توجه به تعداد کلنی‌های برگشتی در نمونه اصلی و شاهد مثبت و منفی، توسط نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این بررسی طبق تست‌های شناسایی و تأییدی کتاب The Prokaryotes و برجی، ۶ نمونه باکتری شامل: لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریس، لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس از ماست و قرص پروبیوتیکی شناسایی و جداسازی شدند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: شناسایی سوبه‌های پروبیوتیکی براساس تست‌های بیوشیمیایی و مرفولوژیکی

شماره	گونه‌های پروبیوتیکی	رشد در دمای (درجه سانتیگراد)			کاتالاز	حرکت	از آرتین	تخمیر کربوئیدرات												گروه لاکتوباسیل
		۱۵	۴۵	۴۵ و ۱۵				سلونیوز	لاکتوز	مانیتول	رافینوز	گالاکتوز	ملی پیوز	سوکروز	مالتوز	مالتوز	ترهالوز	سوربیتول	آسکولین	
۱	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (قرص و ماست)	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	گروه ۱
۲	لاکتوباسیلوس پلاتناروم (ماست)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	گروه ۲
۳	لاکتوباسیلوس بولگاریس (ماست)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	گروه ۱
۴	لاکتوباسیلوس کازئی (ماست)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	گروه ۲

ادامه جدول شماره ۱

شماره	گونه پروبیوتیکی	تخمیر کربوهیدرات														رشد در دمای (درجه سانتیگراد)			کاتالاز	حرکت	اوره آز
		زایلوز	مانوز	فروکتوز	گالاکتوز	سوکروز	مالتوز	ترهالوز	مانیتول	سالیسین	سوربیتول	آرایینوز	رافینوز	دیوز	لاکتوز	اینولین	سلویوز	۱۵			
۱	بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (قرص)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	

سوش *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* از نظر جهش *Rfa*، جهش *Uvr B* و پلازمید *R-Factor* مثبت بود. همچنین رشد کلنی در محیط بیوتین، هیستدین و عدم رشد آن در محیط بیوتین کنترل، نشانگر وابستگی سوش به هیستدین بوده است. همچنین وجود هاله شفاف اطراف دیسک نشانگر عدم رشد سلول‌ها و وجود جهش *Rfa* بود. این جهش سبب کاهش نسبی سد لیپو پلی ساکاریدی شده و سطح باکتری را می‌پوشاند و قابلیت نفوذ مولکول‌های بزرگ را افزایش می‌دهد. همچنین عدم تشکیل هاله در اطراف دیسک، وجود پلاسمید *R-Factor* را در این باکتری ثابت می‌کند. از طرفی، عدم رشد در ناحیه پرتودیده، نشان‌دهنده جهش *Uvr B* می‌باشد. اثر ضد جهش‌زایی سوپرناتانت (مایع رویی کشت) باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از ماست و قرص پروبیوتیکی روی مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم در حضور باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم *TA100* و حضور و عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (*S₉*) در جدول شماره ۲ و ۳ آورده شده است. این جداول نشان‌دهنده درصد مهار این باکتری‌ها از ۱۰۰-٪ می‌باشند.

سویه پروبیوتیکی جدا شده از ماست و قرص پروبیوتیکی توانست در حضور عصاره میکروزوم کبد (*S₉*)، ماده جهش‌زای سدیم آزید را بیش از ۴۰٪ مهار کند، که مهارکنندگی بسیار خوبی محسوب می‌شود. اما گونه *لاکتوباسیلوس بولگاریس* ماست با مهار ۴۰٪ نتوانست جهش‌زایی قوی از خود نشان دهد (جدول شماره ۲، ۴). در این بررسی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قرص با مهار ۶۶٪، بیشترین توانایی را از خود نشان داد. همچنین توانایی مهارکنندگی این باکتری‌ها در مقابل سدیم آزید، زمانی که عصاره میکروزوم کبد (*S₉*) در محیط وجود نداشت، کاهش چشمگیری پیدا کرد. از طرفی، در محیط فاقد عصاره میکروزوم (*S₉*)، *لاکتوباسیلوس بولگاریس* و *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* ماست با مهار به ترتیب ۳۱٪ و ۳۲٪، کمترین توانایی ضد جهشی را از خود نشان دادند که توانایی ضد جهشی متوسطی محسوب می‌شود.

جدول شماره ۳: اثر ضد جهش‌زایی سوپرناتانت شش گونه پروبیوتیکی در مقابل پتاسیم پرمنگنات

کلنی‌های برگشتی	<i>S₉</i> و سالمونلا تیفی موریوم <i>TA100</i>	<i>S₉</i> و سالمونلا تیفی موریوم <i>TA100</i>	نمونه‌های آزمایشی
کلنی	درصد	کلنی	درصد
بازدارندگی	بازدارندگی	بازدارندگی	بازدارندگی
۵۹۸	۴۶۱	-	کنترل مثبت
۶۰	۴۵	-	پتاسیم پرمنگنات
۳۲۲	۲۷۵	۴۶٪	کنترل منفی
			DMSO
			لاکتوباسیلوس
			اسیدوفیلوس
			(ماست)
۳۹۲	۳۲۵	۳۴٪	لاکتوباسیلوس
			بولگاریس
			(ماست)
۳۶۰	۳۰۶	۴۰٪	لاکتوباسیلوس
			کازئی
			(ماست)
۳۶۸	۳۱۴	۳۸٪	لاکتوباسیلوس
			پلاتناروم
			(ماست)
۲۵۲	۲۲۲	۵۸٪	لاکتوباسیلوس
			اسیدوفیلوس
			(قرص)
۲۶۸	۲۳۲	۵۵٪	بیفیدوباکتریوم
			بیفیدوم
			(قرص)

جدول شماره ۲: اثر ضد جهش‌زایی سوپرناتانت شش گونه پروبیوتیکی در مقابل سدیم آزید

کلنی‌های برگشتی	<i>S₉</i> و سالمونلا تیفی موریوم <i>TA100</i>	<i>S₉</i> و سالمونلا تیفی موریوم <i>TA100</i>	نمونه‌های آزمایشی
کلنی	درصد	کلنی	درصد
بازدارندگی	بازدارندگی	بازدارندگی	بازدارندگی
۶۱۵	۴۸۵	-	کنترل مثبت سدیم آزید
۶۰	۴۵	-	کنترل منفی
			DMSO
۲۹۵	۲۶۵	۵۲٪	لاکتوباسیلوس
			اسیدوفیلوس
			(ماست)
۳۶۲	۳۳۱	۴۰٪	لاکتوباسیلوس
			بولگاریس
			(ماست)
۳۳۵	۳۱۰	۴۵٪	لاکتوباسیلوس
			کازئی
			(ماست)
۳۵۲	۳۲۸	۴۲٪	لاکتوباسیلوس
			پلاتناروم
			(ماست)
۲۰۵	۱۸۵	۶۶٪	لاکتوباسیلوس
			اسیدوفیلوس
			(قرص)
۲۴۸	۲۰۵	۶۰٪	بیفیدوباکتریوم
			بیفیدوم
			(قرص)

۸۵٪ سرطان‌ها در اثر جهش‌های ژنتیکی به وجود می‌آیند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت بیشتر ترکیبات جهش‌زا به احتمال زیاد سبب سرطان می‌شوند. امروزه استفاده از روش ایمز جهت شناسایی مواد جهش‌زا رایج است که روشی به مراتب ارزان‌تر از سایر روش‌ها می‌باشد. اکثر سویه‌های مورد استفاده در تست ایمز گالاکتوز منفی بوده و به علت اختلال در اپران گالاکتوز دخیل در سنتز لیپو پلی ساکارید سطح باکتری، در بیماری‌زایی دچار نقص هستند. به‌طور کلی مکانیسم‌هایی که باکتری‌های پروبیوتیک برای کاهش مواد موتاسیون‌زا و سرطان‌زا به کار می‌گیرند کاملاً شناخته شده نیست (۱۶). اما برخی از آنها عبارتند از:

۱- اتصال به ماده موتاسیون‌زا و جلوگیری از جذب

آنها توسط بدن و تجزیه برخی ترکیبات موتاسیون‌زا
El-Nezami در بررسی خود به این نتیجه رسید که لاکتوباسیلوس *ra* منسوس در شرایط *In Vitro* توانایی اتصال به آفلاتوکسین را دارد (۱۷). همچنین لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها توانایی تجزیه ترکیبات N-نیتروز آمین موجود در مواد غذایی که از عوامل مهم ایجاد سرطان محسوب می‌شوند، را نیز دارند (۱۸).

۲- کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های مضر و مهار باکتری‌های مضر روده

آنزیم‌های مدفوعی مانند نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز، β -گلوکورونیداز، گلیکولیک اسید هیدرولاز قادرند ترکیبات پیش‌جهش‌زا و پیش‌سرطان‌زا را به ترکیبات جهش‌زا و سرطان‌زا تبدیل کنند. این آنزیم‌ها توسط باکتری‌های مضر روده تولید می‌شوند و ثابت شده است که کاهش این آنزیم‌های مضر که رابطه مستقیمی با کاهش باکتری‌های مضر دارد، ریسک ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهد. در بررسی Goldin و همکارانش، گزارش‌هایی حاکی از توانایی لاکتوباسیلوس *ca* ژنی در کاهش فعالیت سه آنزیم مضر β -گلوکورونیداز، نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز به دست آمد (۱۹، ۲۰).

۳- تولید متابولیت‌های ویژه و کاهش اسیدهای صفراوی

باکتری‌های پروبیوتیک برخی از متابولیت‌ها مانند بوتیرات، فولات و ... تولید می‌کنند که با اثر بر روی سلول‌های اپی‌تلیال روده، تکثیر سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهند. Biffi و همکارانش در مطالعه خود نشان دادند تولید متابولیت‌ها توسط باکتری‌های پروبیوتیک با جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی ارتباط دارد (۲۱).

تنها ۳ سویه پروبیوتیکی جدا شده از ماست و قرص پروبیوتیکی توانستند در حضور عصاره میکروزوم کبد (S₉)، ماده جهش‌زای پرمنگنات پتاسیم را بیش از ۴۰٪ مهار کنند، ولی گونه‌های لاکتوباسیلوس *bol* گاریس، لاکتوباسیلوس *ca* ژنی و لاکتوباسیلوس *pl* تاروم ماست با مهار به ترتیب ۳۴٪، ۴۰٪ و ۳۸٪ نتوانستند جهش‌زایی قوی از خود نشان دهند (جدول شماره ۳). در این بررسی لاکتوباسیلوس *as* فیلوس *as* فیلوس قرص با مهار ۵۸٪، بیشترین توانایی را از خود نشان داد. توانایی مهار کنندگی این باکتری‌ها در مقابل پرمنگنات پتاسیم، زمانی که عصاره میکروزوم کبد (S₉) در محیط وجود نداشت کاهش چشمگیری یافت، و هنگامی که عصاره میکروزوم (S₉) در محیط نبود، لاکتوباسیلوس *bol* گاریس ماست با مهار ۲۹٪ کمترین توانایی ضد جهشی را از خود نشان داد. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد جهشی و ضد سرطانی در حضور و عدم حضور S₉ در تست ایمز، نشان داد تعداد کلنی‌های برگشتی القاشده با مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم در تمامی آزمایش‌ها انجام شده در بالاترین سطح به ترتیب برابر ۶۱۵، ۵۹۸ و تعداد کلنی‌های برگشتی در شاهد منفی در پایین‌ترین سطح خود برابر با ۴۵ بوده است. در جداول ۳ و ۴، بالاترین اثر مهار کنندگی را لاکتوباسیلوس *as* فیلوس *as* فیلوس قرص از خود نشان داده است که این اثر مهار کنندگی در حضور عصاره میکروزوم کبد S₉ بیشتر از زمانی است که این عصاره در محیط وجود ندارد. همچنین کمترین اثر ضد جهشی در لاکتوباسیلوس *bol* گاریس مشاهده شد. به‌طور کلی در این مطالعه، باکتری‌های مورد بررسی اثرات خوب جهش‌زایی از خود نشان دادند که این اثرات در حضور عصاره میکروزوم کبد به مراتب بیشتر بود. با توجه به حدود اطمینان و معنی‌داری در ارتباط با فعالیت ضد جهشی سویه‌های پروبیوتیکی مورد آزمون با $p \leq 0.05$ ، می‌توان از درستی آزمون در حضور دو ماده جهش‌زای به کار برده شده اطمینان حاصل کرد.

بحث

در طی چند دهه گذشته، وجود میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در انواع مختلف غذاها به خصوص فرآورده‌های لبنی در حال افزایش بوده است. لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها جزء باکتری‌های پروبیوتیک محسوب شده و هر دو فلور طبیعی روده هستند که اثرات مفید بسیاری روی سلامت انسانها دارند (۱۵).

۴- تحریک سیستم ایمنی

سلول‌های باکتری‌های پروبیوتیک قادرند سبب تحریک و تقویت سیستم ایمنی و افزایش میزان سیتو کین شوند، همچنین عاملی برای ممانعت از رشد تومور و کاهش سرطان باشند (۲۲). Sekine و همکارانش در بررسی خود، اثرات مثبت بیفیدوباکتریوم/ینفتیس را در تحریک سیستم ایمنی موش در مهار مواد موتاسیون‌زا نشان دادند (۲۳). همچنین تحقیقات انجام شده، نقش مثبت باکتری‌های پروبیوتیکی را در کاهش عوامل جهش‌زا تأیید می‌کنند.

در مطالعه Chalova و همکارانش، توانایی سوپرناتانت (مایع رویی کشت) برخی باکتری‌های پروبیوتیک اعم از لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم‌های استاندارد در فازهای مختلف رشد در کاهش دو ماده موتاسیون‌زای بنزوپیرن و سدیم آزید بررسی شد که اثرات مناسبی در کاهش این مواد توسط سوپرناتانت باکتری‌ها مشاهده گردید. طی این بررسی بیفیدوباکتریوم آدولسنسی ATCC 15703 در فاز رشد با مهار ۴۸/۷۰٪ و لاکتوباسیلوس پلاتاروم ATCC 8014 در فاز سکون با مهار ۵۹/۳۷٪ ماده جهش‌زای بنزوپیرن، بیشترین توان را از خود نشان دادند و لاکتوباسیلوس پلاتاروم ATCC 8014 با مهار ۵۴/۶۴٪ در فاز سکون، بیشترین فعالیت را در مهار ماده جهش‌زای سدیم آزید از خود نشان داد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز سویه‌های پروبیوتیکی مورد بررسی، توانایی‌های خوب ضد جهشی از خود نشان دادند که لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس جدا شده از قرص پروبیوتیکی با مهار ۶۶٪ سدیم آزید در حضور عصاره میکروزوم کبد و ۶۱٪ در عدم حضور عصاره میکروزوم کبد، بیشترین توانایی را در کاهش ماده جهش‌زای سدیم آزید از خود نشان داد و لاکتوباسیلوس پلاتاروم جدا شده از ماست پروبیوتیکی توانست ۴۲٪ سدیم آزید را در حضور عصاره میکروزوم کبد کاهش دهد. در بررسی Heui-Dong و همکارانش، فعالیت *Lactobacillus plantarum* KLAB21 ایزوله شده از کیمچی (kimchi) در مهار ۴ ماده سرطان‌زای آفلاتوکسین B₁، MNNG، NQO و NPد با استفاده از تست ایمز با کمک ۲ سویه TA100 و TA98 مورد بررسی قرار گرفت که سوپرناتانت کشت باکتری با مهار ۹۸/۴٪ ماده جهش‌زای MNNG در حضور سویه TA100 و مهار ۵۷/۳٪ ماده جهش‌زای NQO در حضور سویه TA98، بیشترین توانایی را از خود نشان داد (۲۵). در طی این مطالعه، لاکتوباسیلوس پلاتاروم جدا شده از ماست

پروبیوتیکی در مهار جهش‌زایی دو عامل جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم در حضور سویه TA100، حضور و عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (S₉) بررسی شد که بیشترین اثر مهار کنندگی را در حضور عصاره میکروزوم کبد با مهار ۳۸٪ پرمنگنات پتاسیم و ۴۲٪ سدیم آزید از خود نشان داد. در بررسی Zobel و همکارانش، لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و عصاره کشت این باکتری مانع از آسیب DNA توسط MNNG که یک ماده سرطان‌زا می‌باشد گردید (۲۶). در مطالعه حاضر نیز سوپرناتانت کشت لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس جدا شده از ماست و قرص پروبیوتیکی، بیشترین فعالیت ضد جهشی را در مقابل دیگر سویه‌های پروبیوتیکی تست شده از خود نشان داد. Reddy و همکارانش طی بررسی به این نتیجه دست یافتند که با استفاده از کشت‌های باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم می‌توان از گسترش تومورهای سرطانی جلوگیری کرد (۲۷)، در شرایط In Vitro توانایی ضد جهشی سویه‌های پروبیوتیکی با مطالعه حاضر مطابقت داشت.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از محصولات حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، دارای اثرات ضد موتاسیونی و ضد سرطانی بسیار خوبی می‌باشد. آنها با تغییر فلور روده سبب کاهش جذب مواد سرطان‌زا و جهش‌زا شده و به سلامت انسان کمک می‌کنند.

پیشنهادهای

۱. بررسی توانایی ضد جهشی باکتری‌های پروبیوتیکی در حیوانات آزمایشگاهی یا رده کشت سلولی.
۲. شناسایی سویه‌های بومی پروبیوتیکی در ماست و پنیرهای محلی به کمک روش‌های مولکولی و تعیین فعالیت ضد جهشی آنها.
۳. بررسی فعالیت ضد جهشی باکتری‌های پروبیوتیکی در شرایط استرسی مختلف.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه مسئولین شرکت پگاه گیلان، خانم دکتر میترا هاتفی در تهیه سویه *سالمونلا تیفی* موریوم TA100 و سرکار خانم محمدیان کمال تشکر را داریم.

References:

1. Namiki M. Antioxidants/antimutagenes in Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990;29(4):273-300.
2. Wollowski I, Balkalinsky AT, Neudecker C, Pool Zoobel BL. Bacteria Used for Production of Yogurt Inactivate Carcinogens and Prevent DNA. Damage in the Colon of Rats. *J Nutr* 1999;129(1):77-82.
3. Hirayama K, Raftar J. The Role of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention. *Microbe Infect* 2000;2(6):681-68.
4. Lo PR, Yu RC, Chou CC, Huang EC. Determinations of the Antimutagenic Activities of Several Probiotic Bifidobacteria Under Acidic and Bile Conditions Against Benzo[a] Pyrene by a Modified Ames Test. *Int J Food Microbiol* 2004;93(2):249-257.
5. De Roos NM, Katan M. Effects of Probiotic Bacteria on Human. *Am J Clin Nutr* 2000;71:405-411.
6. Picard C, Floramonti J. Bifidobacteria as Probiotic Agents-Physiological Effects and Clinical Benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22(6):495-512.
7. Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Method for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Mutagenicity Test. *Mutat Res* 1976;31(6):347-349.
8. Horn RC, Vargas VM. Antimutagenic Activity of Extracts of Natural Substances in the Salmonella/Microsome Assay. *Mutagenesis* 2003;18(2):113-18.
9. Groce CD, Morichetti E, Bronzetti G, Salvadori C. Antimutagenic Investigations of Commercial Yogurt. Antimuagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. Plenum: New York Press; 1993. p. 119-124.
10. Brady LJ, Callader DD, Busta FF. The Role of Probiotic Cultures in the Prevention of Colon Cancer. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):410-14.
11. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, Editors. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd ed. New York: Springer; 2006. p. 320-404.
12. Maron DM, Ames BN. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat Res* 1983;113(3-4):173-215.
13. Gomes-cameiro MR, Daniela MMD. Evaluation of Mutagenic and Antimutagenic Activities of Alpha Bisabolol in the Salmonella/microsome Assay. *Mutat Res* 2005;585(1-2):105-12.
14. Ong TM, Wong WZ, Stewart J, Brockman HE. Chlorophyllin a Potent Antimutagen Against Environmental and Dietary Complex Mixture. *Mutat Res* 1986;173(2):111-15.
15. Shah NP. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science* 2000;83(4):894-907.
16. Hirayama K, Rafter J. The Role of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention. *Microbes Infect* 2000;2(6):681-686.
17. el-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Remove Aflatoxin from Contaminated Media. *J Food Prot* 1998;61(4):466-468.
18. Rowland IR, Grasso P. Degradation of N-nitrosamines by Intestinal Bacteria. *Appl Microbiol* 1975;29(1):7-12.
19. Goldin BR, Gorbach SL. The Effect of Milk and Lactobacillus Feeding on Human Intestinal Bacterial Enzyme Activity. *Am J Clin Nutr* 1984;39(5):756-761.
20. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matt OJ, Mattila-Sandholm T. Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties. *J Biotechnol* 2000;84(3):197-215.
21. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G. Antiproliferative Effect of Fermented Milk on the Growth of a Human Breast Cancer Cell Line. *Nutr Cancer* 1997;28(1):93-99.
22. Matsuzaki T. Immunomodulation by Treatment with Lactobacillus Casei Strain Shirota. *Int J Food Microbiol* 1998;41(2):133-140.
23. Sekine K, Toida T, Saito M, Kuboyama M, Kawashima T, Hashimoto Y. A New Morphologically Characterized Cell Wall Preparation (Whole Peptidoglycan) from Bifidobacterium Infantis with a Higher Efficacy on the Regression of an Established Tumor in Mice. *Cancer Res* 1985;45(3):1300-1307.
24. halvo VI, Lingbeck JM, Kwon YM, Ricke SC. Extracellular Antimutagenic Activities of Selected Probiotic Bifidobacterium and Lactobacillus spp. As a Function of Growth Phase. *J Environ Sci Health B* 2008;43(2):193-198.
25. Heui-Dong P, Chang-Ho R. Antimutagenic Activity of Lactobacillus plantarum KLAB21 Isolated from Kimchi Korean Fermented Vegetables. *Biotechnology Letters* 2001;23(19):1583-1589.
26. Pool Zoble BL, Neudeker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rummney C, Morreti M. Lactobacillus and Bifidobacterium Mediated Antigenotoxicity in Colon of Rats. *Nutr Cancer* 1996;26(3):365-80.
27. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory Effect of Bifidobacterium Longom on Colon, Mammary and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-Methylimidazo (4,5-floroquinoline), A Food Mutagen. *Cancer Research* 1993;53(17):3914-3918.