

## بررسی خواص ضد جهش زایی عصاره الکلی بره موم به وسیله سالمونلا تیفی موریوم و میکروزوم

میترا هاتفی<sup>۱\*</sup>، صدیقه مهراییان<sup>۲</sup>، اشرف السادات نوحی<sup>۳</sup>، رباب رفیعی طباطبائی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه تهران

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران - شمال دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت ۸۶/۱۱/۷، تاریخ پذیرش ۸۷/۱/۲۸

### چکیده

**مقدمه:** در این تحقیق، اثر ضد جهش زایی عصاره الکلی بره موم (پروپولیس) به وسیله آزمون ایمرز در برابر دو ماده جهش زای آزید سدیم و پتاسیم پرمنگنات، در غیاب و حضور میکروزوم های کبدی موش (S9) مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی ابتدا از غلظت های متفاوتی از عصاره الکلی بره موم (۵-۰/۱) درصد، جهت تعیین محدوده ای اثر باکتریوسایدی (MIC) بر روی سویه های آزمایشی استفاده شد. سپس با استفاده از روش آزمون ایمرز، اثر ضد جهش زایی در محدوده ای غیر سمی بررسی شد. در این آزمون از سویه های مختلف سالمونلا تیفی موریوم به نام های TA97 و TA100 استفاده شد که هر یک حامل یک جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود می باشند. سویه های جهش یافته His<sup>-</sup> بر روی پلیت حاوی حداقل مواد معدنی و گلوکز در حضور مواد شیمیایی جهش زا مورد آزمایش کشت داده شدند و به این ترتیب فقط آن دسته از باکتری هایی که با جهش برگشتی، His<sup>+</sup> شده بودند، قادر به رشد و تشکیل کلنی بودند. وجود ماده ای ضد جهش (عصاره الکلی بره موم) در کنار ماده ای جهش زا، میزان کلنی های برگشتی را کاهش داده که با شمارش تعداد آن ها می توان با استفاده از فرمول، میزان ممانعت از جهش را محاسبه کرد. اختلاف بین متوسط تعداد کلنی های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با ماده ای جهش زا، توسط نرم افزار آماری SPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل گردید.

**نتایج:** مقادیر MIC به دست آمده به روشنی نشان داد که عصاره الکلی بره موم در غلظت ۵ درصد دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه سالمونلا تیفی موریوم می باشند. از سوی دیگر در مورد غلظت های ۴-۰/۱ درصد این خاصیت مشاهده نشده و معلوم گشت که عصاره الکلی می تواند در این غلظت ها، اثرات جهش زایی مواد شیمیایی فوق را در یک وضعیت دوز- پاسخ خنثی نماید.

**نتیجه گیری:** در پایان ما به این نتیجه رسیدیم که عصاره الکلی بره موم به واسطه ای دارا بودن انواع ترکیبات مهم مانند فلاونوئیدها دارای خواص ضد جهشی بوده و بالاترین میزان ممانعت از جهش، در غلظت ۴ درصد مشاهده شد که با نتایج حاصل از به کار بردن مخلوط میکروزومی نیز هماهنگی داشت. مکانیزم عمل ضد باکتریایی بره موم پیچیده بوده و هیچ شباهتی با سایر آنتی بیوتیک های کلاسیک ندارد، اما باید به این نکته اشاره کرد که بره موم، مانع از تقسیم سلول باکتریایی می شود. بعضی از محققین معتقدند که بره موم می تواند مانع از فعالیت RNA پلیمرز وابسته به DNA شود.

**واژگان کلیدی:** بره موم، ضد جهش زایی، میکروزوم، سالمونلا تیفی موریوم

\* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی

E-mail: mit\_hatefi@yahoo.com

مقدمه

بره موم از لغت پرو<sup>۱</sup> (به معنای پیش) و پلیس<sup>۲</sup> (به معنای شهر) تشکیل شده است. طبق مشاهداتی که توسط زنبورداران در زمان‌های گذشته انجام گرفته است، زنبورها دیوار و یا سدی از بره موم در جلوی منفذ کندو می‌سازند (به عنوان: پیش شهر). بره موم، می‌تواند باعث استحکام ساختمانی، بهبود وضع تهویه و کاهش لرزش شده و از طریق مسدود نمودن راه‌های عبور فرعی، قدرت دفاعی کندو را در مقابل مهاجمین بالا می‌برد. هم‌چنین نشان داده شده است که این ماده می‌تواند باسیلوس لاروا<sup>۳</sup> (عامل مهم‌ترین بیماری باکتریایی زنبورها) را از بین ببرد (۱).

تحقیقات دانشمندان مختلف، طیف وسیعی از اثرات این ترکیب شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، تغییردهنده سیستم ایمنی و ضد توموری (۲) را نشان داده است. مهم‌ترین اجزای فعال فارماکولوژیکی موجود در بره موم عبارتند از فلاونز، فلاونولز، فلاوانونز (که جمعاً فلاونوئیدها نامیده می‌شوند) و سایر ترکیبات فنولیک و آروماتیک. تاکنون حدود ۳۸ نوع فلاونوئید مختلف از بره موم جدا شده‌اند. مهم‌ترین این مواد عبارتند از: گالانگین<sup>۴</sup>، کائمپفرو<sup>۵</sup>، کوئرستین<sup>۶</sup>، پینوسمیرین<sup>۷</sup>، پینواستروبین<sup>۸</sup> و تعدادی از اسیدهای فنولیک مانند سینامیل‌الکل، سینامیک‌اسید، وانیلین، بنزیل‌الکل‌ها، اسیدبنزوئیک، اسید کافئیک و اسیدفرولیک<sup>۹</sup> (۳). به طور کلی، خواص و رنگ بره موم بستگی به منبع گیاهی خاصی دارد که توسط هر کندو مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴).

در این آزمون از سویه‌های مختلف سالمونلاتیفی موریوم<sup>۹</sup> به نام‌های TA100 و TA97 استفاده شد که هر

یک حامل یک جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود می‌باشند. این جهش مانع از سنتز اسید آمینه هیستیدین می‌شود. در صورتی که سویه‌ی وحشی یا پروتوتروف ( $His^+$ ) قادر است با استفاده از نیتروژن غیر آلی (فسفات آمونوم) و در حضور منبع کربن مناسب (گلوکز)، این اسید آمینه‌ی ضروری را بسازد.

سویه‌های جهش یافته ( $His^-$ ) سالمونلاتیفی موریوم، بر روی پلیت حاوی محیط معدنی و حداقل گلوکز، در حضور ماده‌ی شیمیایی جهش‌زا مورد آزمایش و کشت داده شدند. به این ترتیب فقط آن دسته از باکتری‌هایی که با جهش برگشتی  $His^+$  شده‌اند، قادر به رشد و تشکیل کلنی خواهند بود. وجود ماده ضد جهش در کنار ماده جهش‌زا، میزان کلنی‌های برگشتی را کاهش داده و با شمارش تعداد آن‌ها می‌توان با استفاده از فرمولی که در قسمت نتایج آورده شده است، میزان ممانعت از جهش را محاسبه کرد.

آزید سدیم، ماده جهش‌زای خطرناکی است که ایجاد جهش‌های ناشی از شکستگی کروموزومی می‌کند. در سویه‌های سالمونلاتیفی موریوم جهش یافته، این ماده سبب می‌شود که جهش‌یافته‌های جایگزینی بازی به حالت اولیه خود بازگشت پیدا کنند. فرآیند جهش در سویه‌های دارای نقص در سیستم ترمیم، در تاریکی تسهیل می‌گردد. پرمنگنات پتاسیم، به عنوان یک ماده اکسید کننده قوی ایجاد جهش‌های زیادی در سالمونلاتیفی موریوم می‌کند (۵).

خاصیت دیگر این آزمون استفاده از میکروزوم کبدی (S<sub>9</sub>) برای فعال کردن برخی مواد جهش‌زا و سرطان‌زا است. بسیاری از این ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش‌زایی یا سرطان‌زایی، باید از نظر متابولیسمی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال گردند و از آن جایی که باکتری سالمونلاتیفی موریوم قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا یک عصاره‌ی استریل میکروزمی از بافت پستانداران (مانند rat) به آزمون بررسی اثر ضد جهش‌زایی، اضافه شد. هدف از این مطالعه، تعیین اثرات ضد جهش‌زایی

- 1 - Pro.
- 2 - Polis.
- 3 - Bacillus larvae.
- 4- Galangin.
- 5- Kaempferol.
- 6- Quercetin.
- 7- Pinocembin.
- 8- Pinostrobin.
- 9 - Salmonella typhimurium.

اطمینان به عمل آمد و سپس برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۷).

- تهیه نمونه: بره موم در اواخر زمستان از شهری نزدیک استان خراسان تهیه شد. سپس عصاره الکلی به این ترتیب تهیه گشت: مقدار ۹۰ گرم بره موم به ۴۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد مخلوط گردید. سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی<sup>۶</sup> در لوله جمع آوری و رسوبات مجدداً با ۱۰۰ میلی لیتر اتانول عصاره گیری شد و مراحل قبل تکرار گردید. به این ترتیب عصاره غلیظ ۱-۲ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و جهت حذف اثر ضد میکروبی اتانول، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه تبخیر چرخشی<sup>۷</sup> تکان داده شد (۸). درصد‌های متفاوتی از عصاره الکلی ۰/۱ تا ۵ درصد در این آزمایش استفاده شد.

- تعیین فعالیت ضد میکروبی (MIC)<sup>۸</sup>: روش رقت در آگار مطابق با دستورالعمل کمیته ملی راهنمای استاندارد آزمایشگاهی بالینی (NCCLS)<sup>۹</sup> انجام گرفت. مقادیر متفاوت بره موم به محلول‌های آگار استریل در دمای ۴۸ درجه سانتی گراد برای رسیدن به غلظت نهایی ۰/۱ تا ۵ درصد اضافه شده و پس از اختلاط کامل در پلیت‌های استریل ریخته شد تا سرد شود. تلقیح با اضافه کردن ۰/۱ میلی لیتر از اینوکولوم باکتریایی  $10^9 \times 2-1$  CGU/ml سویه وحشی سالمونلا تیفی موریوم و توزیع یکنواخت آن روی سطح آگار دارای بره موم انجام گرفت. با استفاده از میله شیشه‌ای Z شکل استریل تمامی سطح پلیت به طور کامل پوشش داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. حداقل غلظت

عصاره اتانولی بره موم (EEP)<sup>۱</sup> در برابر دو ماده جهش‌زای شناخته شده آزید سدیم ( $\text{NaN}_3$ ) و پرمنگنات پتاسیم ( $\text{KMnO}_4$ ) با استفاده از آزمون ایمز و عصاره میکروزمی می‌باشد.

## روش کار

- مواد شیمیایی: کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمون از شرکت مرک<sup>۲</sup> تهیه شد. در این مطالعه آزید سدیم و پرمنگنات پتاسیم به عنوان مواد جهش‌زا به کار گرفته شدند.

- میکروارگانسیم‌های مورد آزمون: سویه‌های باکتریایی سالمونلا تیفی موریوم TA100 و TA97 در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند.

- تأیید ژنوتیپ سویه‌های آزمایش‌شده: این کار قبل از شروع هر آزمون باید انجام شود. برای این منظور از کشت‌های نوترینت برات شبانه استفاده شد. سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم دارای یک نقص و یا موتاسیون در ژن ترمیم در برابر تاریکی (uvrB) بوده و قادر به سنتز پروتئین دیواره سلولی نیز نیستند (rfa). همچنین سویه‌ها برای حضور فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین بررسی شدند. این یک شناساگر<sup>۳</sup> متداول است که می‌تواند حضور پلاسمید R- فاکتور را نشان دهد (۶).

- مخلوط میکروزمی: تهیه مخلوط S<sub>0</sub> مطابق با روش شرح داده شده توسط مارون و ایمز (۱۰) انجام گرفت. عدم آلودگی فرآورده، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از مخلوط S<sub>0</sub> به محیط کشت تاپ آگار<sup>۴</sup> و ریختن آن روی محیط MGA<sup>۵</sup> انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، از استریل بودن مخلوط تهیه شده

6- Supernatant.

7 - Rotary evaporator.

8 - Minimum Inhibitory Concentration.

9 -National Committee for Clinical Laboratory Standard Guideline.

1 -Ethanolic Extracts of Propolis.

2 - Merk.

3- Marker.

4 - Top agar.

5- Minimal Glucose Agar.

### نتایج

مقادیر MIC به دست آمده از آزمون ضد باکتریایی انجام گرفته، به روشنی نشان داد که بره موم (EEP) ۵ درصد دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه سالمونلا تیفی موریوم می‌باشند اما در مورد غلظت‌های ۴-۱/۰ درصد عصاره الکلی بره موم خاصیت ضد باکتریایی مشاهده نشد.

اثر ضد جهش‌زایی  $\text{NaNO}_3$  و  $\text{KMnO}_4$  در غیاب نمونه‌های مورد آزمایش به صورت ممانعت ۱۰۰ درصد یا ۰ درصد تعیین شد. محاسبه درصد بازدارندگی مطابق فرمول زیر انجام گرفت:

$$100 \cdot \frac{A-B}{A} = \text{درصد بازدارندگی}$$

در این فرمول B، تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در حضور ماده موتاژن و نمونه مورد آزمایش و A تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در حضور کنترل مثبت می‌باشد. تعداد فرکانس جهش خودبه‌خودی از تفریق صورت و مخرج کسر به دست می‌آید. اثرات ضد جهش‌زایی، زمانی که اثر بازدارندگی بین ۲۵ درصد تا ۴۰ درصد باشد، متوسط و زمانی که بیشتر از ۴۰ درصد باشد، قوی قلمداد می‌شود. مقادیر کمتر از ۲۵ درصد، ضعیف بوده و جزء نتایج مثبت منظور نمی‌شود. در تحقیق انجام گرفته، اثر ضد جهش‌زایی به صورت منحنی دوز- پاسخ با دو ماده پروموتاژن افزایش می‌یابد (۱۳).

جداول ۲ و ۳، به ترتیب نتایج گرفته شده در مورد ماده جهش‌زای آزید سدیم و پتاسیم پرمنگنات را نشان می‌دهد.

ممانعت کننده از رشد (MIC) پایین‌ترین غلظتی از EEP بود که از هرگونه رشد باکتریایی جلوگیری می‌کرد (۹).

آزمون ضد جهش‌زایی: آزمون ضد جهش‌زایی بر اساس آزمون سالمونلا/میکروزوم شرح داده شده توسط مارون (۱۰) و نیز آزمون تغییر داده شده توسط مورتلمانز و زایگر انجام گرفت (۱۱). روش کار با استفاده از طی کردن ۱۰ دقیقه دوره پیش انکوباسیون در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از سویه‌های باکتریایی رشد داده شده (کشت شبانه ۱۶ ساعته) با غلظت  $10^9 \times 2-1$  CFU/ml، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف EEP استریل و ۱۰۰ میکرولیتر عوامل جهش‌زا در لوله‌های تاپ آگار انجام گرفت. در همه آزمایش‌ها برای کنترل‌های منفی، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و برای کنترل‌های مثبت ۱۰۰ میکرولیتر از آزید سدیم و پرمنگنات سدیم اضافه گردید. به منظور انجام چند چرخه تقسیم سلولی و ایجاد یک زمینه رشد باکتریایی که با چشم مسلح قابل رؤیت و قابل شمارش باشد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ میلی مولار هیستیدین/ بیوتین به هر لوله اضافه شد. بعد از ریختن محتویات لوله‌های تاپ آگار روی پلیت‌های مینیمال گلوکز آگار و گرم خانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت شمارش شد. جهت اطمینان از درستی نتایج برای هر ماده، پلیت‌های دوگانه در نظر گرفته شد. آزمون ضد تومورزایی، مطابق با روش ضد جهش‌زایی در حضور مخلوط S<sub>9</sub> انجام شد (۱۲).

جدول ۱. فعالیت ضد باکتریایی بره موم در غلظت‌های مختلف

درصد غلظت پروپولیس	۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	۱	۱/۲۵	۱/۵	۱/۷۵	۲	۲/۲۵	۲/۵
غلظت باکتری $10^9 \times \text{CFU}$	۱/۴۲	۱/۴۱	۱/۴۲	۱/۴۲	۱/۴۱	۱/۴۲	۱/۴۳	۱/۴۱	۱/۴۲	۱/۳۷	۱/۳۶

ادامه جدول ۱.

درصد غلظت پروپولیس	۲/۷۵	۳	۳/۲۵	۳/۵	۳/۷۵	۴	۴/۲۵	۴/۵	۴/۷۵	۵
غلظت باکتری $10^9 \times \text{CFU}$	۱/۳۳	۱/۳۱	۱/۳۲	۱/۳۲	۱/۳۱	۱/۳	۱/۵۷	۰/۳	۰/۲۲	۰/۰۹

جدول ۲. ارزیابی اثر ضد جهش‌زایی بره‌موم در شرایط آزمایشگاه در برابر آزید سدیم با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S<sub>9</sub>

سالمونلا تیفی موریوم TA97				سالمونلا تیفی موریوم TA100				درصد غلظت پروپولیس
در حضور S <sub>9</sub>		در غیاب S <sub>9</sub>		در حضور S <sub>9</sub>		در غیاب S <sub>9</sub>		
تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	
-	۴۶	-	۳۵	-	۷۴	-	۵۱	کنترل منفی
-	۹۲۸	-	۶۲۵	-	۱۱۰۸	-	۴۶۴	کنترل مثبت
۲	۹۰۵	۱	۶۱۸	۴	۱۰۶۰	۲	۶۳۱	۰/۱
۱۲	۸۱۵	۱۱	۵۵۷	۱۶	۹۳۴	۱۱	۵۷۳	۰/۵
۲۱	۷۳۳	۲۲	۴۸۶	۲۳	۸۵۵	۱۵	۵۵۲	۱
۳۱	۶۴۳	۳۵	۴۰۹	۳۰	۷۷۸	۲۸	۴۶۷	۱/۵
۳۵	۵۹۹	۳۷	۳۹۵	۳۴	۷۳۵	۳۱	۴۴۵	۲
۴۰	۵۶۰	۴۰	۳۷۶	۳۶	۷۰۴	۳۴	۴۲۸	۲/۵
۴۴	۵۲۴	۴۳	۳۵۹	۴۰	۶۶۳	۴۰	۳۸۷	۳
۴۸	۴۷۸	۴۵	۳۴۳	۴۹	۵۶۸	۴۷	۳۴۰	۳/۵
۵۵	۴۱۸	۵۲	۳۰۰	۵۵	۴۹۷	۵۵	۲۹۰	۴

جدول ۳. ارزیابی اثر ضد جهش‌زایی بره‌موم در شرایط آزمایشگاه در برابر پیتاسیم پرمنگنات با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S<sub>9</sub>

سالمونلا تیفی موریوم TA97				سالمونلا تیفی موریوم TA100				درصد غلظت پروپولیس
در حضور S <sub>9</sub>		در غیاب S <sub>9</sub>		در حضور S <sub>9</sub>		در غیاب S <sub>9</sub>		
تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	تعداد کلنی‌های بازدارندگی	درصد برگشتی	
-	۳۸	-	۳۳	-	۴۸	-	۴۲	کنترل منفی
-	۵۸۹	-	۳۹۸	-	۶۶۹	-	۴۶۳	کنترل مثبت
۱	۵۸۶	۲	۳۹۲	۱	۶۶۰	۱	۴۵۹	۰/۱
۴	۵۶۵	۱۰	۳۵۹	۹	۶۰۹	۵	۴۴۲	۰/۵
۸	۵۴۳	۱۹	۳۲۳	۱۶	۵۶۱	۸	۴۲۵	۱
۱۱	۵۲۳	۲۸	۲۸۵	۲۴	۵۰۹	۱۱	۴۱۲	۱/۵
۱۴	۵۰۴	۳۷	۲۵۱	۲۷	۴۸۷	۱۹	۳۷۷	۲
۱۹	۴۲۹	۴۸	۲۰۵	۳۲	۴۵۵	۲۷	۳۴۰	۲/۵
۲۲	۴۶۱	۵۹	۱۶۴	۳۸	۴۱۷	۳۴	۳۰۴	۳
۲۵	۴۳۹	۶۹	۱۲۵	۴۲	۳۸۵	۴۴	۲۶۱	۳/۵
۲۹	۴۱۷	۷۸	۸۸	۴۸	۳۴۹	۵۱	۲۲۸	۴

نتایج با توجه به آزمون HSD<sup>۱</sup> مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۴). با توجه به تعیین حدود اطمینان و

نتایج حاصل از تعداد کلنی‌های برگشتی در هر سویه آزمایشی با در نظر گرفتن شاهد منفی (آب مقطر استریل + باکتری) و شاهد مثبت (آزید سدیم و یا پیتاسیم پرمنگنات + باکتری) وارد برنامه نرم‌افزاری SPSS گردید.

1- Tuckey test, Honest Significant Difference (HSD).

معنی داری در ارتباط با سویه‌های گفته شده و غلظت‌های مختلف ماده مورد آزمون، با  $p \leq 0/05$  می‌توان از درستی نتایج آزمون‌ها در حضور هر دو نوع ماده جهش‌زای به کار برده شده، اطمینان حاصل کرد.

## بحث

بره موم ماده چسبنده صمغ‌مانندی است که توسط زنبورها از جوانه برگ‌ها و پوست درختان به خصوص درختان تبریزی، توس و کاج جمع‌آوری می‌شود. بره موم حاوی مقادیر بالایی از ویتامین‌ها به خصوص ویتامین B کمپلکس، ویتامین C، ویتامین E، و پروویتامین A است. این ماده دارای مواد معدنی و عناصر کمیابی مانند کلسیم، منیزیم، آهن، روی، سیلیکا، پتاسیم، فسفر، منگنز، کبالت و مس می‌باشد. علاوه بر این، بره موم حاوی مقادیر بسیار بالایی از بی‌فلاونوئیدها می‌باشد. فلاونوئیدها ترکیبات گیاهی شناخته شده‌ای هستند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و نیز خواص ضد التهابی می‌باشند.

نتایج به دست آمده از آزمون ضد باکتریایی نشان داد که بره موم در مقادیر ۴ درصد به بالا برای سالمونلا تیفی موریوم سویه وحشی، سمی می‌باشد ولی در غلظت‌های بین ۰/۱ درصد تا ۴ درصد هیچ گونه اثر سمی مشاهده نمی‌شود. لذا مقادیر بالاتر از ۴ درصد، برای بررسی خواص ضد جهش‌زایی مورد نظر قرار نگرفتند.

وجود اختلاف معنی‌دار بین متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با موتاژن‌ها و نیز غلظت‌های مختلف ۰/۱ درصد تا ۴ درصد عصاره الکلی با استفاده از آزمون‌های آماری (HSD) تفسیر شد. بررسی آزمون‌های آماری صحت نتایج به دست آمده را تأیید می‌کند.

رائو و همکاران در سال ۱۹۹۲ اثرات ضد جهش‌زایی سه استر اسید کافئیک موجود در بره موم را نشان داده و آن را به طور مصنوعی ساختند. آن‌ها توانایی ضد جهش‌زایی این مواد را در مقابل سویه‌های TA100

TA8 & و ماده جهش‌زای ۳، ۲- دی میتل ۴- آمینوبیفنیل<sup>۱</sup> نشان دادند (۱۵). چزماریک و همکاران در سال ۱۹۹۸ اثر ضد جهش‌زایی نیترووین<sup>۲</sup> و نیتروگوانتیدین<sup>۳</sup> را در مقابل TA97 & TA100 بررسی نمودند (۱۶). جنگ و همکاران در سال ۲۰۰۰، مدارکی دال بر ماهیت ضد جهش‌زایی دو دسته از جهش‌زاهای مستقیم و غیرمستقیم را ارائه نمودند. در بررسی آن‌ها برای ماده جهش‌زای مستقیم از I-NP و I-NO و ماده جهش‌زای غیرمستقیم از IQ و بنزو {آفا} پیرین<sup>۴</sup> در حضور مخلوط میکروزومی S<sub>9</sub> استفاده شده بود (۱۷). فو و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثرات ضد جهش‌زایی بره موم را در شرایط *in vitro* و *in vivo* بررسی نمودند. در مطالعه آن‌ها از سالمونلا تیفی موریوم TA97 & TA100 به عنوان مدل آزمایشی در شرایط آزمایشگاهی در برابر ماده جهش‌زای مستقیم DMC و ماده جهش‌زای غیرمستقیم 2AF با یا بدون استفاده از مخلوط میکروزومی S<sub>9</sub> استفاده شده بود. آن‌ها نشان دادند که بره موم می‌تواند از جهش‌زایی هر دو ماده جهش‌زای DMC و 2AF در یک وضعیت دوز- پاسخ جلوگیری کند (۱۸). اوهل و همکاران در سال ۲۰۰۳، اثرات ضد جهش‌زایی کریسین<sup>۵</sup> (CR) را روی سویه‌های باکتریایی TA100 TA98 & در مقابل مواد جهش‌زای مستقیم ۲- آمینو-۱- میتل-۶- فنیلیمیدازو {۴/۵-ب} پیریدین (PhIP) و بنزو {آفا} پیرین<sup>۶</sup> نشان دادند. آن‌ها محدوده مناسب برای بروز اثرات ضد جهش‌زایی را ۱۰۰-۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین کردند (۱۹).

در مطالعات ما با سالمونلا تیفی موریوم TA100 TA97 &، در همه دوزهای عصاره الکلی بره موم مورد آزمایش (علی رغم حضور S<sub>9</sub> یا در غیاب آن) توانایی ممانعت از جهش‌زایی در مورد دو موتاژن KMnO<sub>4</sub> و

1 - Dimethyl-4-aminobiphenyl.

2 - Nitrovin.

3 - Nitroguanidine.

4 - Benzo[α]pyrene.

5 - Chrysin.

6 - 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) & benzo[α]pyrene.

2. Kawabe M, Lin C, Kimoto N, Sano M, Hirose M. Modifying Effects of propolis on Mel Qx promotion of Rat hepatocarcinogenesis and in a female Rat two- stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. *Nutrition and Cancer* 2000;37(2):179-86.
3. Harborne JB. *The Flavonoids Advances in research since 1986*. 1st ed. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRC; 1994.
4. Isla MI. Study on propolis quality from Argentina. *Biocell* 2005;29(1):60.
5. Olsen O, Wang X, Wettstein DV. Sodium Azide mutagenesis: preferential generation of A.T to G.C transition in the barley Ant18 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8043-7.
6. FDA. Introduction to the template for in vitro bacterial reverse mutation (Ames) test center for food safety and applied nutrition. 2004.
7. Mehrabian S. The Study of Antioxidant and anticarcinogenic green tea and black ea. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2007; 10(6): 989-991.
8. Najafi MF, Vahedi F, Seyyed M, Jomehzadeh HR, Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology* 2007;54:49-56.
9. Wikler MA. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard*. 7th ed.: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2006.
10. Maron DM, Ames BN. Revised Method for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 1982;113:173-215.
11. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mutation research* 2000;455:29-60.
12. Horn RC, Vargas VMF. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay *Mutagenesis* 2003;18(2):113-8.
13. Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. An empirical approach to the statistical analysis

AZS در یک رابطه دوز- پاسخ مشاهده شد. از سوی دیگر نتایج به دست آمده از فعالیت‌های ضد میکروبی بره موم نشان داد که بره موم در غلظت ۴ درصد به بالا برای سویه‌های آزمون‌شده TA100 & TA97 سمی بوده و متعاقباً در این غلظت‌ها اثرات ضد میکروبی به اثرات ضد جهش‌زایی ارجحیت دارد. آزمون ضد تومورزایی بر پایه نتایج آزمون میکروزوم با مخلوط S<sub>9</sub>، نتایج آزمون ضد جهش‌زایی را تأیید می‌کند.

### نتیجه گیری

در پایان، این نتیجه حاصل شد که بهترین محدوده مناسب غلظت برای ظهور اثرات ضد جهش، ۰/۱ درصد تا ۴ درصد می‌باشد. مکانیزم عمل ضد باکتریایی بره موم پیچیده بوده و هیچ شباهتی با سایر آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک ندارد. اما باید به این نکته اشاره کرد که از تقسیم سلول باکتریایی به وسیله بره موم ممانعت می‌شود (مانند نالیدیکسیک اسید که معلوم شده است از همانندسازی DNA و در نتیجه تقسیم سلولی ممانعت می‌کند). بعضی از محققین معتقدند که بره موم می‌تواند مانع از فعالیت RNA پلیمراز وابسته به DNA شود (۲۰).

صدمه ژنتیکی از راه‌ها و مکانیزم‌های مختلفی ایجاد می‌شود و هیچ یک از این آزمون‌ها به تنهایی نمی‌تواند همه مکانیزم‌های احتمالی را بررسی کند، لذا باید از مجموعه‌ای از این ابزارها بهره جست. جزئیات مکانیزم ضد جهش‌زایی بره موم و ترکیبات آن هنوز ناشناخته است. به منظور شناسایی این نکته که کدام یک از ترکیبات بره موم باعث ایجاد اثرات ضد جهش می‌شوند و نیز مکانیزم احتمالی آن ترکیبات، باید مطالعات دیگری انجام گیرد.

### منابع

1. Lubbe J, Politta SS. Propolis, beeswax and the sensitization potential of topical calcineurin inhibitors. *Clinical and experimental Dermatology* 2006;31(1):147.

of mutagenesis data from the Salmonella tests. *Mutation Research* 1992;97:267-81.

14. Spjotvoll E, Stoline MR. An extension of the T-method of multiple comparison to include the cases with unequal sample sizes. *Am Statist Assoc* 1973;68:976-8.

15. Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Reddy BS. Effect of caffeic acid esters on carcinogen - induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem and Biol Interact* 1992;84(3):277-90.

16. Cizmarik J, Lahitova N. Antimutagenicity of propolis. *Pharmazie* 1998;53:883-4.

17. Jeng SN, Shih MK, Kao CM, Liu TZ, Chen SC. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. *Food and Chemical Toxicology* 2000;38(10):893-7.

18. Fu JY, Xia Y, Zheng YY. Antimutagenicity of propolis against some mutagens in vitro and in vivo. *Biomed Environ Sci* 2004;17(4):469-75.

19. Uhl M, Ecker S, kassie F, Lhoste E, Chakraborty A, Mohn G, et al. Effect of Chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) and benzo(a)pyrene (B(a)p) in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells. *Archives of toxicology* 2003; 77(8): 477-84.

20. Garedew A, Schmolz E, Lamprecht I. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. *Thermochemica Acta* 2004;422(1-2):115-24



## Survey of antimutagenic effects of ethanolic extract of propolis by *Salmonella typhimurium*/microsome

Hatefi M<sup>1\*</sup>, Mehrabian S<sup>2</sup>, Nouhi A<sup>3</sup>, Rafiee Tabatabaee R<sup>4</sup>

### Abstract

**Introduction:** In this study, antimutagenesis effect of ethanolic extract of propolis by Ames test against two mutagenic substances named azide sodium and potassium permanganate in the presence and the absence of microsomal homogenate of mouse liver (S<sub>9</sub>) has been investigated.

**Materials and Methods:** In this experimental study at first, different concentrations of ethanolic extract of propolis (0.1-5%) for determining minimum inhibitory concentration (MIC) against tester strains were used. Then by Ames test, antimutagenesis effect was assessed in nontoxic extent. In this test, various strains of *Salmonella typhimurium* (TA100 and TA97) that contained selective mutation in their operon histidine, were used. Mutant strains (His<sup>-</sup>) were grown on culture media containing minimum salt and glucose in the presence of mutagen substances above. So only those bacteria that were reversed by mutation (His<sup>+</sup>) could grow and form colonies on culture media. If antimutagen (EEP) and mutagen substances were gathered, reversed mutation would be reduced and the rate of mutation inhibition could be calculated by means of formula. The differences between the averages of revertants per plate of the sample in relation to the mutagens were analyzed using SPSS software and one-way ANOVA.

**Results:** The resulted MIC values clearly showed that ethanolic extract of propolis at 5% concentration has antibacterial activity against *Salmonella typhimurium*, but in 0.1-4% concentrations, such effects were not seen. Findings also showed that propolis in such concentrations could neutralize mutagenic effects of those substances in a dose dependent manner.

**Conclusion:** Finally we found that ethanolic extract of propolis that contains different kinds of major and important substances like flavonoids, has good antimutagenic effects and the best concentration for obtaining such effect is in 4% which also was confirmed with microsomal results. The mechanism of antibacterial effect of propolis is complex and it has no analogy to any classic antibiotics, but it should be emphasized that bacterial cell division is inhibited by propolis. Some researchers also argue that propolis could inhibit DNA-dependent RNA polymerase.

**Key words:** Propolis, antimutagenic, microsome, *Salmonella typhimurium*

\*Corresponding author;

E-mail: mit\_hatefi@yahoo.com

Address: Department of microbiology, Science & Researches Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.

1 - Student of PhD of microbiology, Science & Researches Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2 - Professor, department of microbiology, Tarbiat Moalem University, Tehran, Iran

3 - Professor, department of microbiology, Science faculty of Tehran University, Tehran, Iran

4 - Assistant Professor, department of microbiology, Tehran North Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran