

## فعالیت آنتی موتاژنی لاکتوباسیل‌های جدا شده از ماست روی موتاژن ۲ - نیتروفلورن

اشرف محبتی مبارز\* Ph.D.، سیدرضا حسینی دوست\*\* Ph.D.  
زهیر محمدحسن\*\*\* Ph.D.، ثمینه کمالی\* M.S.

### چکیده

**هدف:** بررسی فعالیت آنتی موتاژنی لاکتوباسیل‌های جدا شده از چند نمونه ماست مصرفی در تهران. روش بررسی: در این مطالعه تجربی لاکتوباسیل‌ها از ماست در محیط MRS جدا و به صورت زنده، کشته شده و سوپرناتانت کشت با ۲-نیتروفلورن به عنوان یک ماده موتاژن انکوبه شدند. با تست ایمز و سویه استاندارد سالمونلا تیفوموریوم، مهار موتاژن و فعالیت آنتی موتاژنیک این باکتریها مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از ۱۴ ماست منتخب در تهران، لاکتوباسیل اسیدوفیلوس، بولگاریکوس، کازئی و استرپتروموفیلوس جدا و فعالیت آنتی موتاژنیک لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و بولگاریکوس علیه ۲-نیتروفلورن، با تست ایمز و سویه استاندارد سالمونلا تیفوموریوم TA100 نشان داد که سلولهای زنده لاکتوباسیل بولگاریکوس و اسیدوفیلوس انکوبه شده با ۲-نیتروفلورن ۹۷ و ۶۴ درصد توانستند این ماده موتاژن را مهار نمایند. در حالی که این اثرات مهاری در لاکتوباسیل‌های کشته شده به ۳۶-۴۷ درصد و عصاره کشت آنها به ۳۴-۳۰ درصد کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق موید این است که استفاده از لاکتوباسیلها در ترکیبات غذایی می‌تواند اثرات آنتی موتاژنیک خوبی را اعمال و از طرفی با تغییر فلور روده باعث کاهش جذب موتاژنها و کارسینوژنها شود.

**واژه‌های کلیدی:** ۲-نیتروفلورن، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، تست ایمز، آنتی موتاژن

دریافت مقاله: ۱۳/۶/۱۴، پذیرش مقاله: ۱۴/۳/۱۶

\* نویسنده مسئول: ستادیار گروه باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران-ایران \*\* گروه میکروبیولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله «عج»، \*\*\* گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

آدرس پست الکترونیک: Mobarez80@Yahoo.com

## مقدمه

آلودگی مواد غذایی و محیط با موتاژنها یکی از مهمترین مشکلات در دنیای امروز و از عوامل عمده بیماریها از جمله تومور محسوب می شود (۱). هر نوع استراتژی جهت مهار، حذف و غیرفعال کردن موتاژنها و پروموتاژنها دارای ارزش می باشد. لاکتوباسیلها به عنوان فلور نرمال غالب در دستگاه گوارش انسان در تماس مستقیم با مواد توکسیک، موتاژن و پروموتاژن می باشند (۲). این باکتریها با باند شدن به ترکیبات موتاژن مانع از جذب و گسترش آنها در بدن شده (۳-۵) و قادر به تجزیه N-نیتروزآمینها (۶) می باشند. لاکتوباسیلها و ترکیبات محلول آنها به طور مستقیم (۸،۷) و یا با فعال کردن پاسخهای ایمنی سلولار از جمله اپوپتوزیس با سلولهای توموری واکش و مانع از رشد آنها می شوند (۹). این باکتریها و محصولات تخمیر شده توسط آنها دارای فعالیت آنتی موتاژنیک و آنتی کارسینوژنیک بر ضد طیف وسیعی از موتاژنها و پروموتاژنها می باشند (۱۰،۹). ماست از محصولات تخمیری شیر حاوی لاکتوباسیلهای مختلف از جمله لاکتوباسیل بولگاریکوس، اسیدوفیلوس، کازئی است که با ممانعت از تبدیل پروموتاژنها به موتاژنها ریسک ابتلا به سرطان را کاهش می دهد. (۱۲،۱۱،۱) عصاره شیر تخمیر شده با لاکتوباسیل بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس دارای خاصیت آنتی موتاژنی روی اتیل متیل سولفونات و متیل متان سولفونات دو ترکیب کارسینوژن گزارش شده است (۱۴،۱۳). از طرفی لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و عصاره استونی کشت این باکتری مانع از آسیب DNA توسط ان متیل ان نیترو ان نیتروز گوانیدین (MNNG) یک موتاژن شناخته شده موثر در سرطان کلون می شود، البته فراکشن پپتیدوگلیکان و سلولهای فریز درای شده این باکتری نیز دارای اثرات آنتی موتاژنی می باشند (۱۵).

بیفیدوباکتریها از باکتریهای اسیدلاکتیک موجود در دستگاه گوارش دارای اثرات آنتی موتاژنیک قوی علیه موتاژنهای مختلف از جمله بنزوپیرین گزارش شده اند (۱۶). موشهای آلوده شده با موتاژن IQ (۲ آمینو ان متیل ۳ ایمیدازول ۵و۴

کوینولون)، با افزودن بیفیدوباکتریوم لانگوم به غذای این موشها از تومور کلون و کبد ممانعت شد (۱۷). این باکتریها به عنوان پروبیوتیک در درمان و پیشگیری بیماریهای گوارشی نقش مهمی را ایفا می کنند. فعالیت آنتی توموری اینها ممکن است در ارتباط با فعال سازی سیستم ایمنی توسط این باکتریها باشد (۹،۲). اینها به عنوان استارتر در محصولات مختلف لبنی استفاده می شوند. البته مطالعات و شواهد زیادی نیاز است تا گونه های دارای فعالیت آنتی موتاژنی و خصوصیات آنها شناخته شوند. در این مطالعه از ۲- نیتروفلورن از ترکیبات نیتروز، یک موتاژن و کارسینوژن شناخته شده و آلوده کننده محیط زیست، استفاده شد. سپس با جداسازی لاکتوباسیلها از ماست، اثرات آنتی موتاژنیک لاکتوباسیل بولگاریکوس و اسیدوفیلوس علیه ۲-نیتروفلورن، با تست ایمز و سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم TA100 مورد ارزیابی قرار گرفت.

## روش بررسی

۱- جداسازی لاکتوباسیلها. نمونه های مختلف ماست را با محلول رینگر یکنواخت کرده ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون را روی محیط MRS آگار برده و ۴۸ ساعت در ۳۷، ۱۵، ۴۵ درجه انکوبه و با تست کاتالاز، اکسیداز، نترات، تخمیر قندها، مطالعه میکروسکوپی باکتریها و رشد در ۱۵ و ۴۵ درجه، لاکتوباسیلهای مختلف را شناسایی نمودیم.

۲. تهیه سلولهای زنده لاکتوباسیلها. لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و بولگاریکوس را در MRS براث کشت و بعد از سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰g بمدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه و شستن باکتریها با فسفات بافر، آنها را معادل نیم مک فارلند رقیق نمودیم.

تهیه سلولهای کشته شده لاکتوباسیلها. لاکتوباسیلهای کشت داده شده و تهیه شده به روش فوق را در حمام آبگرم در حال جوش بمدت ۲۰ دقیقه حرارت دادیم.

آماده کردن موتاژن. ۲-نیترو فلورن در غلظت ۲ میکروگرم در میلی لیتر در دی متیل سولفوکساید حل شد. البته این مقدار از

استفاده شد.

#### یافته‌ها

هفده گونه لاکتو باسیل از ۱۴ نمونه ماست مختلف در تهران و دارای درصد مختلف چربی جدا شدند. تمامی لاکتوباسیل‌های جدا شده، کاتالاز منفی بودند. لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بولگاریکوس در ۳۷ و ۴۵ اما لاکتو باسیلوس کازئی و پلاتاروم در ۱۵ درجه رشد کردند.

**اثر مهارى لاکتوباسیل اسیدوفیلوس روی ۲-نیتروفلورن.** فعالیت آنتی موتاژنیک لاکتو باسیل اسیدوفیلوس زنده با ماده موتاژن ۲-نیتروفلورن با استفاده از تست تغییر یافته ایمرز مورد ارزیابی قرار گرفت. این باکتری که به عنوان فلور نرمال در انسان و از محصولات پروبیوتیک نیز جدا شده است. فعالیت آنتی موتاژنی این باکتری در جدول ۱ نشان داده شده است. لاکتوباسیل اسیدوفیلوس زنده بیش از ۶۴ درصد توانست ۲-نیتروفلورن را مهار کند، در حالی که این اثر مهارى برای باکتری کشته شده با حرارت به ۳۶ درصد کاهش یافت. البته این مهار موتاژن با زمان انکوباسیون در ارتباط بود بطوریکه در ۴۰ دقیقه انکوباسیون این اثر مهارى افزایش بیشتری را نشان می داد. سوپرناتانت کشت لاکتوباسیل نیز اثر مهارى حدود ۳۰ درصد را نشان داد.

**اثر مهارى لاکتوباسیل بولگاریکوس روی ۲-نیتروفلورن.** فعالیت آنتی موتاژنیک لاکتو باسیل بولگاریکوس زنده با ماده موتاژن ۲-نیتروفلورن با استفاده از تست تغییر یافته ایمرز مورد ارزیابی قرار گرفت. این باکتری که به عنوان استارتر در ماست و به عنوان پروبیوتیک نیز گزارش شده است. فعالیت آنتی موتاژنی این باکتری در جدول ۲ نشان داده شده است. لاکتوباسیل بولگاریکوس زنده بیش از ۹۸ درصد توانست ۲-نیتروفلورن را مهار در حالیکه این اثر مهارى برای باکتری کشته شده به ۴۷ درصد کاهش یافت. البته این مهار موتاژن با زمان انکوباسیون در ارتباط بود بطوریکه با ۴۰ دقیقه انکوباسیون این اثر مهارى افزایش بیشتری را نشان می داد. سوپرناتانت کشت لاکتوباسیل نیز اثر مهارى حدود ۳۴ درصد را نشان داد.

موتاژن طی بررسی اثر سیتوتوکسیسیته آن روی باکتریها انتخاب شد. مطالعات نشان داد که ۲ میکروگرم از ماده موتاژن در هر پلیت مناسب می باشد و بیشتر از آن دارای اثرات توکسیک روی باکتری استاندارد سالمونلا تیفو موریوم می باشد. **ارزیابی آنتی موتاژنیسیته.** ابتدا کشت ۱۰ ساعته سالمونلا تیفی موریوم TA100 در محیط نوترینت برات تهیه شد. لاکتوباسیلها را در MRS برات به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی کشت داده شدند و بعد از سانتریفوز در دور ۵۰۰۰ سلولها از محیط کشت جدا و با بافر فسفات معادل نیم مک فارلند رقیق شدند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از لاکتوباسیلها به طور جداگانه با ۲-نیتروفلورن به عنوان ماده موتاژن به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از سالمونلا تیفی موریوم TA100 به عنوان باکتری استاندارد به مخلوط لاکتوباسیل و موتاژن افزوده شد، سپس با افزودن هیستیدین، بیوتین و اگر ذوب شده (۴۵درجه) به مخلوط فوق، آنها روی محیط دارای حداقل گلوکزبرده شدند و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، تعداد کلنی های رشد کرده سالمونلا تیفو موریوم شمارش شدند. و فعالیت آنتی موتاژنیک لاکتو باسیلها با استفاده از فرمول 
$$\text{Inhibition \%} = \frac{(A-B) - (A-C)}{(A-C)} \times 100$$
 محاسبه شد (۱۶). در این آزمایش از سه پلیت: ۱. کنترل مثبت (حاوی موتاژن و سالمونلا تیفو موریوم TA100) ۲. کنترل منفی (فاقد ماده موتاژن و فقط سالمونلا تیفو موریوم TA 100)

۳. تست (ماده موتاژن انکوبه شده با لاکتوباسیل و سالمونلا تیفو موریوم) استفاده شد. تعداد کلنی های برگشتی در پلیت کنترل منفی (C) به عنوان موتاسیون خودبخودی، کلنی های برگشتی با حضور موتاژن شناخته شده در پلیت کنترل مثبت (A) و کلنی های برگشتی در پلیت تست (B) در نظر گرفته شد.

**آنالیز آماری:** هر نمونه در این تحقیق در سه پلیت کشت داده شد و نتایج به صورت میانگین  $\pm SD$  بیان شدند. از T تست نیز برای ارزیابی مقایسه بین گروههای تست و کنترل

جدول ۱. اثر مهاري لاکتوباسیل اسیدوفیلوس جدا شده از نمونه های مختلف ماست علیه ۲-نیتروفلورن به عنوان موتاژن، با تست ایمز و با استفاده از سالمونلا تیفوئوریم TA100 و فرمول  $Inhibition \% = ((A-B) / (A-C)) \times 100$  مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج سه بار تکرار و بر اساس میانگین  $\pm SD$  ارزیابی شده است

درصد مهار موتاژن	کلنی برگشتی (Revertant)	
—	$437/77 \pm 70/68$	کنترل مثبت
—	$114 \pm 15/39$	کنترل منفی
$64/45 \pm 9/50$	$228/33 \pm 48/04$	لاکتوباسیل اسیدوفیلوس زنده
$36/66 \pm 5/12$	$317/33 \pm 33/62$	لاکتوباسیل اسیدوفیلوس کشته شده
$30/11 \pm 0/59$	$340 \pm 51/41$	عصاره کشت اسیدوفیلوس

A: کلنی برگشتی در حضور موتاژن شناخته شده، B: کلنی برگشتی بدون حضور موتاژن، C: کلنی برگشتی در حضور موتاژن و لاکتوباسیل

جدول ۲. اثر مهاري لاکتوباسیل بولگاریکوس جدا شده از نمونه های مختلف ماست علیه ۲-نیتروفلورن به عنوان موتاژن، با تست ایمز و با استفاده از سالمونلا تیفوئوریم TA100 و فرمول  $Inhibition \% = ((A-B) / (A-C)) \times 100$  مورد ارزیابی قرار گرفته، نتایج سه بار تکرار و بر اساس میانگین  $\pm SD$  ارزیابی شده است

درصد مهار موتاژن	کلنی برگشتی (Revertant)	
—	$437/66 \pm 70/68$	کنترل مثبت
—	$114 \pm 15/39$	کنترل منفی
$97/99 \pm 0/88$	$120/33 \pm 14/36$	لاکتوباسیل اسیدوفیلوس زنده
$47/75 \pm 5/87$	$281/66 \pm 37/2$	لاکتوباسیل اسیدوفیلوس کشته شده
$34/11 \pm 6/9$	$325 \pm 36/37$	عصاره کشت اسیدوفیلوس

A: کلنی برگشتی در حضور موتاژن شناخته شده، B: کلنی برگشتی بدون حضور موتاژن، C: کلنی برگشتی در حضور موتاژن و لاکتوباسیل

## بحث

علیه دو موتاژن محرک سرطان کلون گزارش شده است (۲۰، ۱۹). اینکه چه ترکیبی از شیر اثرات آنتی موتاژنیک دارد ناشناخته است. اما نکته‌ای که مورد توافق همگان است، اینکه فرمانتاسیون شیر توسط میکروارگانیسمها باعث تولید ترکیباتی می‌شود که از شیر به عنوان یک محیط طبیعی جهت تولید ترکیبات آنتی موتاژن در حین رشد استفاده می‌کنند. به عبارتی این فعالیت آنتی موتاژنیک با رشد این باکتریها همراه می‌باشد. (۲۰) البته یک احتمال هم وجود دارد که کازئین شیر به برخی از این موتاژنها متصل شود، اما کازئین در حین تخمیر توسط پروتئاز باکتریها هیدرولیز می‌شود، ولی در هر صورت این

در ۲۰ سال اخیر نقش رژیم غذایی در اتیولوژی سرطان مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه شرایط افزایش یا کاهش فعالیت و یا غیر فعال شدن موتاژنهای محیطی جهت کنترل آنها دارای اهمیت است. باکتریهای اسید لاکتیک در غیر فعال کردن موتاژنها در روده و کاهش ریسک ابتلا به سرطان نقش مهمی دارند. در تحقیقات متعددی اثبات شده که خوراندن ماست به حیوان آزمایشگاهی مانع از سرطان کلون می‌شود (۱۲، ۹، ۱). عصاره استونی ماست تهیه شده با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و ترموفیلوس نیز دارای اثرات آنتی موتاژنیک

آنتی‌موتازنیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بولگاریکوس کشته شده با حرارت کاهش می‌یابد. البته این اثر آنتی‌موتازنیک برای عصاره کشت باکتری به ۳۰-۳۴ درصد رسید لذا باکتری زنده اثر مهاری بسیار بالایی را نسبت به عصاره کشت و سلولهای کشته شده اعمال می‌کند. البته این خود نکته مهمی است که مشخص شود کدام قسمت از سلول باکتری است که در این فعالیت آنتی‌موتازنیک دخالت دارد

**تقدیر و تشکر:** با تشکر از دانشگاه تربیت مدرس بدلیل حمایت مالی از این پروژه و خانم دکتر شاهچراغی در همکاری ایشان در تهیه سویه استاندارد سالمونلا تیغوموریوم.

## References

1. Wollowski I, Ji ST, 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 Nutrition* 1999; 129(1): 77-82.
2. Hirayama K, Raftar J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbe and Infection* 2000; 2: 681-68.
3. Bolognani F, Rumney C J, Rowland IR. Influence of carcinogen binding by Lactic acid producing bacteria on tissue distribution and in vitro mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and chemical toxicol* 2000; 35: 535-545.
4. Zhang XB, Ohta Y. Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole. *Can J Microbil* 1993; 39: 841-845.
5. Morotomi M, Muti M. In vitro binding of potent mutagenic prolyzate to intestinal bacteria. *J national cancer* 1986; 77: 195-201.
6. Rowland IR, Grasso P. Degratation of N-

خود نکته ای است که بایستی مورد توجه واقع شود. لذا حضور ترکیبات آنتی‌موتازن در ماست، این ضرورت را ایجاد می‌کند که هر چه بیشتر در جهت شناسایی اثرات آنتی‌موتازنی این ترکیبات مطالعه کنیم. باتوجه به نقش باکتریهای اسید لاکتیک در کاهش و مهار موتازنها از طریق غیر فعال نمودن آنها در روده، لذا ضروری است که باکتریهای اسید لاکتیک موجود در لبنیات از این جهت مورد بررسی واقع شوند، در این تحقیق با جدا کردن لاکتو باسیلها از ماستهای موجود در ایران، اقدام به مطالعه اثرات آنتی‌موتازنی آنها بر ضد موتازنها نمودیم در این مطالعه از ۲-نیتروفلورن به عنوان موتازن استفاده شد. ۲-نیتروفلورن یک ماده موتازن آلوده کننده محیط زیست می‌باشد. (۲۱) لاکتوباسیلوس بولگاریکوس زنده جدا شده از ماست دارای اثرات آنتی‌موتازنیک قوی (۹۸٪) بر ضد ۲-نیتروفلورن بود، در حالیکه این اثر آنتی‌موتازنیک در لاکتوباسیلهای کشته شده با حرارت به شدت کاهش نشان می‌داد. این اثر آنتی‌موتازنیک در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جدا شده از ماست نیز ۴۷ درصد بود. اثر مهاری مایع رویی کشت لاکتو باسیل اسیدوفیلوس و بولگاریکوس به ترتیب ۳۰ و ۳۴ درصد بود. در مطالعات دیگر استرپ کرموریس جدا شده از پنیر چینی توانایی مهار دو موتازن TRP1 (۳امینو۴ دی متیل H۵ پیرید و ۴ و ۳b اندول و TRP2 (۳ امینو ۱ متیل H ۵ پیریدو ۴ و ۳b اندول) را نشان داده است. (۲۲) این باکتریها با تولید متابولیتهایی قادر به مهار پاتوزنها در یک طیف وسیع می‌باشند و با غیر فعال کردن موتازنها ریسک ابتلا به سرطان را تا حد زیادی کاهش می‌دهند. ولوسکی (۱) مشاهده کرد که لاکتو باسیل بولگاریکوس خوراکی در موش از آسیب DNA توسط ۲ا و ۱ دی متیل‌هیدرازین جلوگیری می‌کند. از طرفی لاکتوباسیل رامنوز دارای اثرات آنتی‌موتازنیک روی آزوکسی‌متان می‌باشد. (۱۲) Motomori و همکاران گزارش نمودند (۵) ، بایندینگ این باکتریها به موتازنها احتمالاً با واسطه پیپتیدوگلیکان و پلی‌ساکارید صورت می‌پذیرد. البته Zhang نشان داد که بایندینگ موتازنها با حرارت کاهش نمی‌یابد. (۲۲)

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه ما مشاهده نمودیم که فعالیت

- nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol* 1975; 29: 7-12.
7. Baricult L, Denariaz G, Houri JJ, Bouley C, Spain C, Trugnan G. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* 1995; 16: 242-252.
8. Reddy GV, Friend BA, Shahani KM, Farmer RE. Antitumor activity of yogurt components. *J food Protection* 1983; 46: 8-11.
9. LeBlung AM, Perdigon G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer *Med Sci monit* 2004; 10 (4): BR96-104.
10. Brady LJ, Daniel D, Busta FF, The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutrition* 2000; 130: 410S-144S.
11. Poweric F, Menon S, Coffman RL. IL-04 and IL-10 synergize to inhibit cell mediated immunity invitro. *Eur J immunol* 1993; 23: 2223-29.
12. Femia AP, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, et al. Antimutagenic activity of the prebiotic inulin enriched with the oligofructose in combination with probiotics *L. rhamnosus* and *B. lactis* on azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 2003; 23(11): 1953-60.
13. Groce CD, Morichetti E, Bronzetti G, Salvadori C. Antimutagenic investigations of commercial yogurt. Antimuagenesis and anticarcinogenesis mechanisms 111. *Plenum New york press* 1993; 119-124.
14. HosonoA, kashina T, Kada T. Antimutagenic properties of Lactic acid cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J Dairy Science* 1986; 59: 543.
15. 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: 365-80.
16. Pen Ren Lo, Roch-chui Yu, Cheng-Chong Chou, Ya-Hui Tasi. Antimutagenic activity of several probiotic *Bifidobacteria* against Banzo(a)Pyrene. *J. Bioscience and Bioengineering* 2002; 94 (2): 148- 53.
17. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium Longom* on colon, mammary and liver carcinogenesis induced by 2-amino-methylimidazo (4,5-flo-roquinoline), a food mutagen. *Cancer research* 1993; 53: 3914-18.
18. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 1983; 113: 173-215.
19. Hosono A. Studies on antimutagenic effect of milk cultured with Lactic acid bacteria on the Trp2 induced mutagenicity to TA98 strain of *Salmonella typhimurium*. *J Dairy Res* 1992; 59: 543.
20. Nadathur SR, Gould SG, Bakalinsky AT. Antimutagenicity of fermented milk. *J. Dairy. Science* 1994; 77: 3287-95.
21. Scheepers PTJ, Straetemans MME, Koopman JP, Bos PR, Nitroreduction and formation of Hemoglobin adducts in Rats with a Human intestinal microflora. *Environmental Health Prospective* 1994; 102(56):39-41.
22. Zhang XB, Ohta Y. Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from chinese cheese to mutagenic prolyzates. *J Dairy Science* 1990; 73: 2702-10