جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره نهم، شماره ۱، بهار ۸۶

بررسی اثرات جهش زایی و سرطان زایی سه ترکیب افزودنی به نفت خام میدان سیری (واقع در خلیج فارس) . توسط باکتری سالمونلا تیفی موریوم (Amestest)

مژگان امتیازجو*
(عهده دار مکاتبات)
آنیتا خنافری*
*استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
سارا عابدین
کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
سارا عشق آبادی
کارشناس ارشد شرکت نفت فلات قاره

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۲/۶ تاریخ پذیرش:۸۵/۴/۸

چکیده

نفت و دیگر ترکیبات شیمیایی که در حین اجرای پروژه از حفاری تا انتقال به خطوط لوله ، مورد استفاده قرار می گیرند ، ممکن است، دارای اثرات جهش زایی ، سرطان زایی یا سمیت بالایی بوده و از سویی دیگر تخلیه و ورود این ترکیبات به محیطهای آبی موجب شود تا دامنه تاثیر این پروژه ها وسیع تر شده، و به زنجیره ها و شبکه های غذایی که در نهایت به انسان ختم می شوند آسیب برساند .

در این مطالعه، اثرات ژنوتوکسیک ترکیبات شیمیایی ضد خوردگی محلول در نفت ، آبزدا (دمولسیفایر) و ضد کف نفت که طی فرآیند های مختلف به نفت افزوده می شوند، از طریق تست Ames، با استفاده از سوشهای باکتری سالمونلا تیفی موریوم جهش یافته ، در حضور و عدم حضور میکروزوم کبدی (S۹) ، مورد بررسی قرار گرفتند .

در این پژوهش، سه سوش TA۹۷، TA۱۰۰ و TA۱۵۳۵ سالمونلا تیفی موریوم به روش Plate incorporation در آزمون Ames ، جهت بررسی اثرات ژنوتوکسیک مواد مورد آزمایش مذکور ، بکار گرفته شد . در فاز دوم آزمایشات به هر آزمون به طور جداگانه میکروزومهای کبدی موش که در شرایط کاملا استریل از قبل تهیه شده بود ، جهت بررسی سرطانزایی مواد مورد آزمایش افزوده گردید .

نتایج بدست آمده نشان داد که نمونه های آبزدا و ضد خوردگی محلول در نفت در دوز ۱۰µl ژنوتوکسیک بودند و در دوزهای ۱۰۰µl و ۲۵۰µl اثر سمی داشتند . ضد کف نفت در دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اثرات جهش زایی و سرطانزایی خود را نشان داد و در دوز ۲۵۰µl سمی بود .

بطور کلی افزودن مواد شیمیایی به نفت خام و آبهای تزریقی سبب افزایش خاصیت ژنوتوکسیک و سمی می شود . نظر به اینکه، ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ بشکه در روز ، آب حاوی مواد شیمیایی مذکور و مواد شیمیایی دیگر که، جهت اهداف خاصی به آب تزریقی افزوده می شود ، به محیط زیست دریای خلیج فارس تخلیه می شوند ، امید است که با تولید و جایگزین کردن ترکیبات دیگر با اثرات ژنوتوکسیک و سمی کمتر و متناسب با ترکیب نفت منطقه سیری ، گام بزرگی، در حفظ سلامت محیط زیست خلیج فارس و حفظ تنوع زیستی این اکوسیستم پهناور برداشته شود .

واژه های کلیدی: تست ایمز ، سالمونلا تیفي موریوم ، ژنوتوکسیک ، دمولسیفایر، نفت، ضدکف، ضد خوردگی

مقدمه

محیط اطراف ما، مملو از مواد سرطانزا است . این عوامل قادرند، با تغییر در توالی اسیدهای نوکلئیک DNA ، باعث القا موتاسیون و بروز سرطان شوند . شناسایی مواد یا عوامل القا کننده جهش نقش مهمی را در تعیین سلامت ، ایفا می نمایند. زیرا، این عوامل جهش زا ، گاهی سبب ایجاد آسیب

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

به سلول های پایه جنینی و موتاسیون قابل توارث از نسلی به نسل دیگر می شوند .

بدیهی است که، دسترسی به روشی ارزان ، سریع و آسان ، برای شناسایی مواد شیمیایی جهش زا، از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱) .

یکی از روش های ساده و مهم، بررسی موتاسیون زایی ترکیبات شیمیایی ، استفاده از باکتری ها است. به دلیل تکثیر سریع و شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی و ژنتیك باکتری ها، امکان گسترش سویه های خاص حساس به محدوده وسیعی از موتاژن ها، به آسانی میسر می باشد (۲) .

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 اسیدآمینه هیستیدین روشن و خاموش می شوند و مواد جهش زا چگونه کنترل این مکانیسم را مختل می کند(۲).

سالمونلا باسیل گرم منفی با ابعاد ۵–۲×۱/۵–۰/۷ میکرون ، هوازی و بی هوازی اختیاری و شیمیوارگانوتروف است و درجه حرارت بهینه برای رشد این باکتری ۳۷°C می باشد (۳).

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 کمك تست ایمز[1] 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، بر روی بیش از ۵۰۰۰ نوع ماده شیمیایی ، از سوی مرکز مطالعات و تحقیقات جهش زایی محیط زیست انجام گرفت (۳) .

در تست ایمز، از سوش های مختلف، باکتری سالمونلا تیفی موریوم استفاده می شود . هر کدام از این سوش ها، دارای یك موتاسیون، انتخابی دراپرن هیستیدین خود می باشند. این موتاسیون مانع از انجام یک فعالیت متابولیک ضروری می شود . در صورتیکه سویه وحشی یا پروتوتروف (فنوتیپ His^+) قادر است با استفاده از نیتروژن غیر آلی (فسفات آمونیوم) و در حضور منبع کربن مناسب (گلوکز) ، این اسید آمینه ضروری را بسازد (۴) .

سوش های سالمونلا تیفی موریوم در تست ایمز، اگزوتروف (His^-) بوده و زمانی که سویه های آزمایشی بر روی پلیت های آگار حداقل حاوی مقدار ناچیزی هیستیدین ، در حضور ماده شیمیایی 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(۲) .

تمام سویه ها با ایجاد یک موتاسیون خاص، در اپرن هیستیدین خود ، به تنهایی قادر به سنتز این اسید آمینه نیستند. تغییرات ژنتیکی یا 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 ، بجز سویه TA ۱۰۲ . موتاسیون کاهشی uvrB سبب حذف مکانیسم سیستم ترمیم برشی (Excition repair) و آسیب به DNA می شود . موتاسیون کاهشی در ژن bio باکتری را نیازمند به اسید آمینه بیوتین می سازد .
- موتاسیون rfa، در تمام سویه ها سبب ایجاد یک لایه لیپوپلی ساکارید ناقص (LPS) در سطح باکتری شده و باکتری را، نسبت به مواد شیمیایی درشت (بزرگ) که از دیواره سلول طبیعی عبور نمی کنند نفوذ پذیرتر می سازد .
- وجـــود پلاسمید pKM ۱۰۱ در سـویه های TA۱۰۲، TA۱۰۰، TA۹۷، TA۹۸ و TA ۱۰۴ سبب افزایش موتاسیون زایی شیمیایی یا القایی توسط UV شده و این پلاسمید باکتری را نسبت به آمپی سیلین مقاوم می سازد .
- سـویه TA۱۰۲ علاوه بر پلاسمید pKM۱۰۱ دارای یک پلاسمید چند نسخه ای pAQ۱ است که حامل ژن his G ۴۲۸ بوده که یک ژن مقاوم به تتراسیکلین است. سویه های واجد پلاسمیدهای فوق را سویه های دارای R-factor نامند (۲ ، ۵) .

ویژگی منحصر به فرد این آزمون، استفاده از میکروزوم کبدی (S۹) برای فعال کردن برخی مواد جهش زا و سرطان زا

1- Ames test

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 (مانند rat) را می توان به تست جهش زایی اضافه نمود .

Ames و همکارانش ارتباط بین سرطان زایی و جهش زایی را در حدود ۸۳٪ گزارش نمودند (۵ ، ۶) .

امروزه، اقتصاد کشورها، خصوصاً بسیاری از کشورهای خلیج فارس، به درآمدهای هنگفت حاصل از صنعت نفت، وابستگی زیادی داشته و نفت به عنوان شاهرگ اقتصادی از اهمیت ویژه ای برخوردار است .

بیشتر ذخایر نفت و گاز در دنیا، در منطقه فلات قاره موجود است و منطقه سیری واقع در خلیج فارس به لحاظ استراتژیک و انجام عملیات استخراج نفت و تردد کشتی های نفت کش، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. فرآیندهای یاد شده سبب شده تا این منطقه، یکی از مناطق پر خطر از نظر آلودگی نفتی و مشتقات آن باشد .

Pasquini. R و همکارانش در سال ۱۹۸۹، قیر، که یک ترکیب پیچیده مشتق شده از نفت است را از نظر توانایی جهش زایی مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنان نشان داد که قیر، به دلیل داشتن محتوای بالای هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه، دارای اثرات جهش زایی بالایی بوده و اثرات ژنوتوکسیکی آن با افزودن S۹ به میزان محسوسی افزایش می یابد (۷).

این تحقیق، با هدف بررسی اثرات ژنوتوکسیک سه ماده افزودنی به نفت خام (ضد کف ، آبزدا و ضد خوردگی محلول در نفت) ، انجام گرفت . این مواد در نهایت ، از طریق چاله جمع آوری فیزیکی نفت به اکوسیستم دریایی خلیج فارس تخلیه می شوند و چنانچه مشخص شود که، دارای اثرات جهش زایی یا سرطان زایی است ، از مراحل عمل آوری نفت، حذف و یا، با ترکیباتی با همان کارآیی و اثرات موتاژنیك کمتر، جایگزین شوند.

روش بررسی

در این آزمون آزمایه های شیمیایی عبارت بودند از:

۱– تعلیق شکن (آبزدای نفت)

Demulsifier PNX ۲۳۶۰

۲– ضد خوردگی محلول در نفت LAVAN- ۱

۳– ضد کف نفت Antifoam X-۷-۱

مواد شیمیایی مورد آزمایش با همکاری شرکت نفت فلات قاره تهیه شد .

سویه های باکتریایی در این تحقیق، سه سوش TA ۱۵۳۵ ، TA ۹۷ و TA ۱۰۰ مورد تائید قرار گرفتند (۳،۲) و در نتیجه کار با این سه سوش دنبال شد. سویه های مذکور مستقیماً توسط پروفسور ایمز به صورت دیسک ارسال شدند . دیسک ها، وارد محیط کشت نوترینت براث شده و جهت احیاسازی ، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور C ۳۷° قرار داده شد و سپس، به مدت ۲۴ ساعت، بر روی محیط کشت نوترین آگار در حرارت C ۳۷° گرما گذاری شد (۳ ، ۲) .

آزمون های تایید ژنوتیپ سوش ها ، درسوش های TA۹۷،TA۱۵۳۵ و TA۱۰۰، حساسیت به کریستال ویولت تأیید جهش rfa ، حساسیت به پرتو UV تأیید جهش uvrB ، حساسیت یا مقاومت نسبت به آنتی بیوتیك پنی سیلین تأیید وجود یا عدم وجود پلاسمید (R-factor) ، عدم قدرت رشد در محیط فاقد اسید آمینه هیستیدین تأیید نیازمندی به هیستیدین و عدم قدرت رشد در محیط فاقد اسید آمینه بیوتین تأییدی بر نیازمندی سه سوش آزمایشی به بیوتین بود (۳ ، ۲) .

برای تهیه S۹ ، موش ها به مدت ۲۴ ساعت گرسنگی داده شدند تا ترشح آنزیم های کبدی به واسطه گرسنگی تحریک شوند و افزایش یابند. سپس با گردن زدن ، حیوان را کشته، کبد حیوان با یک پنس استریل خارج گردید. سپس کبدها در کلرید پتاسیم سرد ۰/۱۵M استریل وتازه تهیه شده ، چندین بار شستشو داده شدند تا گلبول های قرمز که مانع از فعالیت آنزیم های سیتوکروم P۴۵۰ می گردند ، خارج شوند. پس از شستشو ، کبدها در یک هاون چینی استریل با قیچی استریل خرد و کاملاً له شدند . سپس، به ازای هر گرم کبد موش ۳cc 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 ۸۷۰۰ rpm (۹۰۰۰ g) و دمای ۴°C سانتریفوژ شدند. بدین ترتیب، گلبول های قرمز جدا و مایع رویی شیری رنگ، قابل استفاده شد. سپس، طبق دستورالعمل ایمز، با کوفاکتورهای لازم در دمای ۴°C مخلوط گردید (۶) .

آزمون جهش زایی با استفاده ازسالمونلا تیفی موریوم TA۹۷,TA۱۵۳۵ و TA۱۰۰

مراحل کار، بدین صورت بود که، ۰/۲ml محلول هیستیدین/ بیوتین ، ۰/۱ml از کشت تازه شبانه سوش های TA۹۷،TA۱۵۳۵ و TA۱۰۰به صورت جداگانه و غلظت های مختلفی از ضد خوردگی محلول در نفت ، آبزدا (دمولسیفایر) و ضد کف افزودنی به نفت به لوله های حاوی ۲ml محیط تاپ آگار (حدود ۴۵° C) ، افزوده شد. سپس، محتویات لوله ها، پس از ۳ ثانیه تکان دهی، توسط شیکر لوله بطور یکنواخت در سطح پلیت های گلوکز آگار حداقل گسترده شدند.بعد از سفت شدن آگار ، پلیت ها را وارونه کرده و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در انکوباسیون ۳۷°C قرار داده شدند . بدلیل نامحلول بودن ماده شیمیایی ضدکف نفت۱-۷-X در محیط تاپ آگار ، آزمون جهش زایی به روش Well Method انجام شد(۱۰) . بدین صورت که محتویات لوله تاپ آگار، بدون افزودن ماده مذکور، بر روی پلیت گلوکز آگار، حداقل توزیع شد و پس از سفت شدن محیط، در مرکز پلیت چاهک ایجاد شد و ماده شیمیایی مذکور، به مقادیر مختلف (۱۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر) در داخل چاهک انتقال یافت .

همچنین کنترل های مثبت و منفی نیز در این آزمون در نظر گرفته شدند. کنترل منفی شامل ۰/۱ml آب مقطر استریل ، ۰/۱ml کشت تازه شبانه سوش های سالمونلا تیفی موریوم TA۹۷،TA۱۵۳۵ و TA۱۰۰ بصورت جداگانه وهمراه با ۰/۲ml محلول هیستیدین/ بیوتین در درون ۲ml محیط تاپ آگار ذوب شده در دمای ۴۵° C بود که پس از ۳ ثانیه تکان دهی بر روی پلیت های گلوکز آگار حداقل توزیع و در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرما گذاری گردید(۳ ، ۲) .

حضور کنترل منفی برای نشان دادن تعداد باکتری هایی که جهش برگشتی خودبخودی می یابند، در مورد هر سوش آزمایشی، ضروری است. کنترل مثبت این آزمون برای مقایسه نتایج ، شامل ۰/۱ml محلول آزیدسدیم به عنوان یك ماده جهش زای قوی ، ۰/۱ml کشت تازه شبانه سوش های آزمایشی، همراه ۰/۲ml محلول هیستیدین بیوتین ، در درون ۲ml محیط تاپ آگار ذوب شده در دمای ۴۵° C بود. بعد از پایان دوره گرما گذاری پلیت ها از انکوباتور خارج شده و تعداد کلنی های برگشتی در پلیت های آزمایشی و کنترلی، شمارش گردید (۳ ، ۲) .

آزمون سرطانزایی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم و میکروزوم کبد موش (S۹)

در این آزمون علاوه بر افزودن ، ۰/۱ml کشت تازه شبانه سویه های سالمونلا تیفی موریوم جهش یافته TA۹۷،TA۱۵۳۵ و TA۱۰۰، ۰/۲ml محلول هیستیدین/ بیوتین و غلظت های مختلف مواد شیمیایی مورد آزمایش، به ۲ml محیط تاپ آگار، ۰/۵ml از مخلوط S۹ تازه تهیه شده نیز به لوله ها اضافه گردید و پس از ۳ ثانیه تکان دهی ، محتویات لوله ها به روی سطح پلیت های گلوکز آگار حداقل توزیع و پس از بسته شدن محیط ، پلیت ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در ۳۷° C گرماگذاری شدند.به عنوان کنترل مثبت از سدیم آزید (۰/۱ ml) و به عنوان کنترل منفی از آب مقطر استریل (۰/۱ ml) طبق روش گفته شده، در بالا استفاده شد. لازم به ذکر است ، همه آزمایشات در سه تکرار همزمان انجام شد (۳ ، ۸).

روش آماری

در این تحقیق، اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزارآماری SPSS مورد آزمون قرار گرفت و نتایج حاصل با توجه به آزمون LSD (نوعی آزمون مورد استفاده در تحلیل های آماری)مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و به صورت دو سویه تفسیر گردید .

مرز معنی داری روی $P \leq ۰/۰۵$ قرار داده شد .

نتایج

در این تحقیق، سه سوش TA۹۷،TA۱۵۳۵ و TA۱۰۰ باکتری سالمونلا تیفی موریوم، از نظر وجود جهش های uvrB ، rfa ، وجود پلاسمید (R-factor) ، نیازمندی به هیستیدین و نیازمندی به بیوتین، مورد تائید قرار گرفتند.

براساس نتایج حاصل از آنالیز آماری داده ها، در مورد نمونه دمولسیفایر در آزمون جهش زایی، بین سوش های آزمایشی در P ≤۰/۰۵ ،اختلاف معنی داری وجود داشت. کاهش در تعداد کلنی های برگشتی، در مقایسه با کنترل منفی، با افزایش دوز ماده مورد آزمایش، در هر سه سوش قابل مشاهده است که بیانگر سمیت بالای دمولسیفایر در دوزهای ۱۰۰µl و ۲۵۰µl می باشد (نمودار-۱) . بنابر نتایج و داده های مذکور نمونه دمولسیفایر با حدود اطمینان ۹۹درصد در دوز ۱۰µl جهش زا (تعداد کلنی های برگشتی دو برابر کنترل منفی) و در دوزهای ۱۰۰ و۲۵۰ میکرولیتر سمی گزارش می گردد.

بر اساس نتایج حاصل در مورد نمونه دمولسیفایر در آزمون سرطان زایی در حضور میکروزوم کبدی (S۹) ، ماده مذکور از دوز ۵۰µl اثرات سمی نشان داده است. بدلیل سمی بودن دوزهای ۱۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر دمولسیفایر در آزمون جهش زایی، دوزهای مذکور از آزمون سرطان زایی حذف شدند (نمودار–۲). بنابر نتایج بدست آمده داده های موجود، نمونه امولسیفایر در دوزهای ≤ ۱۰µl با کنترل منفی همپوشانی داشته و با حدود اطمینان ۹۹درصد ، در این دوز غیر سرطانزا و در دوزهای ≤ ۵۰µl سمی گزارش می گردد .

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری داده ها در مورد نمونه ضد کف نفت در آزمون جهش زایی ، بین دوزهای آزمایشی در P≤۰/۰۵ اختلاف معنی داری وجود داشت و در دوزهای پایین، تعداد کلنی های برگشتی در هر سه سوش، دو برابر یا بیشتر از دو برابر تعداد کلنی های برگشتی کنترل منفی بود، در صورتیکه در دوز بالا (۲۵۰µl) این تعداد کاهش چشمگیری پیدا کرده است (نمودار–۳) .

در مجموع ضد کف نفت ، با حدود اطمینان ۹۹درصد در دوزهای ۱۰µlو ۱۰۰µl اثر جهش زایی و در دوز ۲۵۰µl اثر سمی قابل توجهی خواهد داشت .

بر اساس نتایج حاصل در مورد نمونه ضد کف نفت در آزمون سرطان زایی در حضور میکروزوم کبدی (S۹) ، اثر سرطان زایی در دوزهای ۱۰µl و ۱۰۰µl ماده مذکور مشاهده گردید و در دوزهای ≤ ۲۵۰µl اثرات سمی ماده ضد کف نفت۱–۷–X با حدود اطمینان ۹۹درصد گزارش می گردد (نمودار–۴) .

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری داده ها در مورد نمونه ضد خوردگی محلول در نفت LAVAN–۱ در آزمون جهش زایی ، بین سوش های آزمایشی در P ≤۰/۰۵ هیچگونه اختلاف معنی داری پیدا نشد که نشان دهنده همسویی نتایج در هر سه سوش آزمایشی می باشد، ماده ضد خوردگی محلول در نفت در دوز ۱۰µl جهش زا و در دوزهای بالاتر ۱۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر با توجه به کاهش تعداد کلنی های برگشتی در مقایسه با کنترل منفی، سمی خواهد بود (نمودار–۵) .

بر اساس نتایج حاصل در مورد نمونه ضد خوردگی محلول در نفت در آزمون سرطان زایی در حضور میکروزوم کبدی (S۹) ، این ماده در دوز ۱۰µl اثر سرطانزایی را نشان می دهد زیرا تعداد کلنی های برگشتی آن در مقایسه با کنترل منفی دو برابر شده است . بدلیل سمی بودن ماده مذکور در دوزهای ۱۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر ، فقط دوزهای ۱۰ و ۵۰ میکرولیتر مورد سنجش آزمون سرطان زایی قرار گرفتند (نمودار–۶). احتمال می رود که اثرات سمی ترکیب LAVAN–۱، با توجه به کاهش تعداد کلنی های برگشتی در مقایسه با کنترل منفی ، از دوز ۵۰µl آغاز گردد .

تفسیر نتایج

تنوع و تداوم حضور مواد شیمیایی در هوا ، آب و غذا از یك سو و نقش عوامل محیطی، به عنوان یکی از مهمترین جنبه های بروز سرطان از سویی دیگر ، باعث شده که مطالعه جهش زایی و سرطان زایی مواد شیمیایی ، مورد توجه خاصی قرار گیرد. سلامت اکوسیستم های دریایی به عنوان یکی از مهمترین منابع تغذیه ای، از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

زیرا، هر گونه عامل جهش زا در این اکوسیستم پهناور، می تواند توسط بدن انواع آبزیان جذب شود و تغذیه انسان از این منابع غذایی با ارزش ، زمینه تماس با مواد جهش زا را فراهم نموده و خطر ابتلا به سرطان را در انسان افزایش دهد .

در این پژوهش اثرات جهش زایی و سرطان زایی سه ماده افزودنی به نفت خام (ضد کف نفت ، آبزدا و ضد خوردگی محلول در نفت) که در نهایت ، به اکوسیستم دریایی خلیج فارس تخلیه می گردند ، مورد بررسی قرار گرفت . گروهی از مواد مورد استفاده در آزمون

تعلیق شکن (PNX Demulsifier ۲۳۶۰)، مخلوطی از اکسی آلکیلات ها در یک سیستم حلال ایزوبوتانل و هیدروکربن آروماتیک می باشد که جهت شکستن امولسیون های آب در روغن طراحی شده است و به میزان ppm ۲۵–۲۰ به نفت افزوده می شود .

گروه دوم ، ضد خوردگی محلول در نفت (LAVAN–۱) ، به طور اختصاصی جهت جلوگیری از خوردگی در چاه های نفت و flow lines ، استفاده می شود و از خوردگی حاصل از حمله سولفید هیدروژن ، دی اکسید کربن و اسیدهای آلی، ممانعت می نماید و به میزان ppm ۲۰ به نفت افزوده می شود.

و گروه سوم ضد کف نفت AntifoamX–۷–۱ ، یک پلی مر سیلیکونی است که جهت کنترل و از بین بردن کف ها و حباب ها در شرایطی که کف زایی ایجاد مشکل می نماید ، استفاده می شود و به میزان ppm۰/۳–۰/۲ به نفت افزوده می گردد .

نتایج این تحقیق نشان داد ، ترکیب تعلیق شکن در دوز ۱۰ میکرولیتر جهش زا و غیر سرطان زا و در دوز های بالاتر اثرات سمی دارد . ضد کف نفت در دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتر جهش زا وسرطان زا و در دوز ۲۵۰ میکرولیتر سمی است . ضد خوردگی محلول در نفت در دوز ۱۰ میکرولیتر جهش زا و سرطان زا و در دوزهای بالاتر سمی می باشد .

در بین سوش های آزمایشی سوش TA ۱۵۳۵ بیشترین حساسیت را نسبت به هر سه ترکیب مورد آزمایش دارد.

Bathini و همکارانش در سال ۲۰۰۲ ، ۵ ترکیب شیمیایی که دارای باند دو گانه کربن بودند را مورد سنجش ژنوتوکسیسیته توسط تست Amesقرار دادند. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که سویه TA۱۵۳۵ حساسترین سوش به ترکیباتی با ساختمان هیدروکربنی است ، که با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر همسویی کامل دارد (۸).

با افزایش دوز ، در مورد هر سه ترکیب تعلیق شکن ، ضد کف نفت و ضد خوردگی محلول ، اثرات سمی مشاهده شد .

Sfluckiger و همکارانش در سال ۲۰۰۴ ، ۱۹ ترکیب شیمیایی مشابه را با استفاده از سوش های ۹۷TA و(۷۰۰۹–TA ۷۰۰۱) مورد سنجش تست ایمز قرار دادند. یافته های آنان نیز نشان داد، بسیاری از این ترکیبات با افزایش دوز اثرات سمی شان را بروز می دهند (نظیر نفیل آمین، سیکلوفسفامید، متیلن بیس کلر و آنیلین) (۹).

Green و Muriel در سال ۱۹۷۶، معادله زیر را برای محاسبه فرکانس موتاسیون ارائه نمودند(۱۰)

بر اساس این معادله، فرکانس موتاسیون در مورد ماده شیمیایی تعلیق شکن، برابر ۰/۵۲، ضد کف نفت برابر ۲/۰۴ و ضد خوردگی محلول در نفت برابر ۰/۵۵ محاسبه شد. با در نظر گرفتن فرکانس موتاسیون، و تعداد کلنی های برگشتی در مورد هر سه ترکیب (نمودارهای ۶–۱) ، می توان ضد کف نفت را به عنوان جهش زا ترین و سرطان زا ترین ترکیب و تعلیق شکن را به عنوان سمی ترین ترکیب در بین سه ماده مورد آزمایش، معرفی نمود.

در سال ۲۰۰۴ ، Wakabayashi و همکارانش ، عنوان نمودند، ترکیبات مختلف را می توان بر اساس تعداد کلنی های برگشتی ، به ۴ گروه زیر تقسیم نمود :

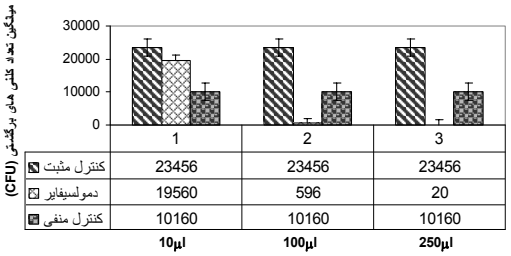
۱–جهش زای ضعیف (۵۰۰ کلنی برگشتی)

۲–جهش زای متوسط (۲۵۰۰–۵۰۰ کلنی برگشتی)

۳–جهش زای قوی (۵۰۰۰–۲۵۰۰ کلنی برگشتی)

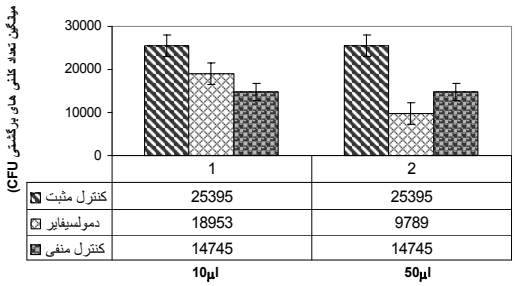
۴–جهش زای بسیار قوی(بیش از ۵۰۰۰ کلنی برگشتی)(۱۱).

$$\text{فرکانس موتاسیون} = \frac{\text{پلیت آزمایش / جهش یافته ها}}{\text{پلیت آزمایش / سلول های زنده}} - \frac{\text{پلیت کنترل / جهش یافته ها}}{\text{پلیت کنترل / سلول های زنده}}$$



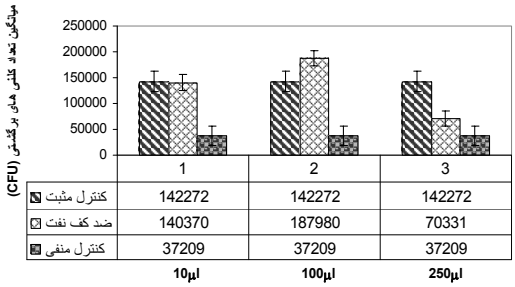
Error bars: +/- ۰/۰۵ SE

نمودار ۱- میانگین فراوانی تعداد کلنی های برگشتی نمونه Demulsifier PNX ۲۳۶۰ و کنترل های مثبت و منفی در آزمون جهش زایی با استفاده از سوش های TA ۱۰۰ ، TA ۹۷ و TA ۱۵۳۵ .



Error bars: +/- ۰/۰۵ SE

نمودار ۲- میانگین فراوانی تعداد کلنی های برگشتی نمونه Demulsifier PNX ۲۳۶۰ و کنترل های مثبت و منفی در آزمون سرطان زایی با استفاده از سوش های TA ۱۰۰ ، TA ۹۷ ،TA ۱۵۳۵ و S۹ .

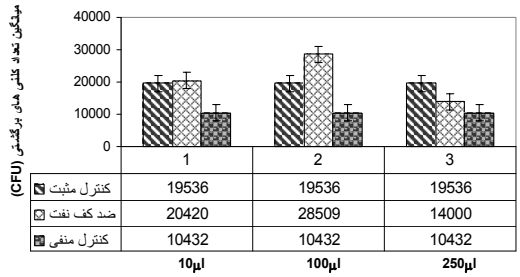


Error bars: +/- ۰/۰۵ SE

نمودار۳- میانگین فراوانی تعداد کلنی های برگشتی نمونه ضد کف نفت X-۷-۱ و کنترل های مثبت ومنفی درآزمون جهش زایی با استفاده از سوش های TA ۱۰۰ ، TA ۹۷ و TA ۱۵۳۵.

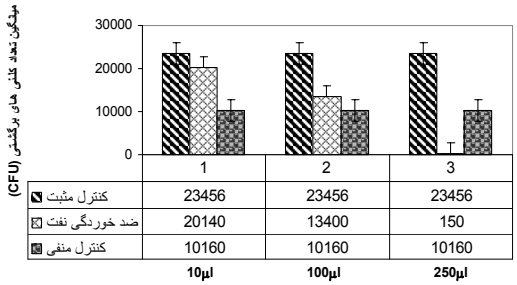
بنابراین هر سه ترکیب دمولسیفایر، ضدکف نفت و ضدخوردگی محلول در نفت ، در گروه ترکیبات بسیار جهش زا قرار خواهند گرفت .

Blackburn و همکاران (۱۹۸۴) ، دریافتند که ارتباط محکمی بین جهش زایی و محتوای ترکیبات آروماتیک چند



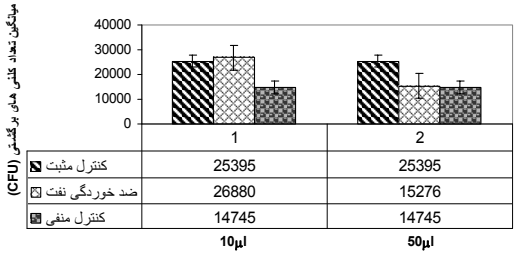
Error bars: +/- ۰/۰۵ SE

نمودار ۴- میانگین فراوانی تعداد کلنی های برگشتی نمونه ضد کف نفت X-۷-۱ و کنترل های مثبت و منفی در آزمون سرطان زایی با استفاده از سوش های TA ۱۰۰ ، TA ۹۷ ، TA ۱۵۳۵ و S۹ .



Error bars: +/- ۰/۰۵ SE

نمودار ۵- میانگین فراوانی تعداد کلنی های برگشتی نمونه ضد خوردگی محلول در نفت LAVAN-۱ و کنترل های مثبت و منفی در آزمون جهش زایی با استفاده از سوش های TA ۱۰۰ ، TA ۹۷ و TA ۱۵۳۵.



Error bars: +/- ۰/۰۵ SE

نمودار ۶- میانگین فراوانی تعداد کلنی های برگشتی نمونه ضد خوردگی محلول در نفت LAVAN-۱ و کنترل های مثبت و منفی درآزمون سرطان زایی با استفاده از سوش های TA ۱۰۰ ، TA ۹۷ و TA ۱۵۳۵ و S۹ .

حلقه (Polycyclic Aromatic Compound) ترکیبات نفتی وجود دارد (۴).

Krewski و همکارانش در سال ۱۹۹۲ اثرات سرطانزایی حاصل از اندرکنش ۲۰۰ ماده شیمیایی سرطانزا متعلق به ۱۰ گروه از ترکیبات شامل هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه

(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)، آمین های آروماتیک ، نیتروز آمین ها ، نیتروز آمیدها و رنگهای آزو را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که ۹۰٪ این ترکیبات با یکدیگر اثر سینرژیستی داشته و مخلوط دو تایی مواد مورد آزمایش اثر ژنوتوکسیکی بالاتری نسبت به هر یک از مواد بطور جداگانه داشتند (۱۲).

آنها همچنین گزارش کردند که افزایش غلظت S۹ در روند آزمون Ames سبب افزایش حساسیت باکتری سالمونلا تیفی موریوم نسبت به ترکیبات پیچیده هیدروکربنی نظیر نفت و محصولات نفتی می گردد (۱۲).

پیشنهادات

۱. حذف یا جایگزین نمودن ترکیبات جهش زای مورد آزمایش با ترکیباتی با همان کارایی و با اثرات جهش زایی و سرطان زایی کمتر.
۲. بررسی اثرات ژنوتوکسیک پساب خروجی از چاله EPA ، حتی پس از تصفیه و حذف آلاینده ها.
۳. قید هر گونه اثرات زیانبار ژنوتوکسیک یا سمی زیست محیطی مواد مورد استفاده در صنایع مختلف ، در جدول ویژگی های مواد .
۴. بررسی اثرات سرطان زایی ترکیبات سرطان زا در تست Ames ، توسط Cell line های مختلف، جهت ردیابی مکانیسم سرطان زایی آنها.
۵. بررسی اثرات جهش زایی و سرطان زایی تمامی پساب های صنعتی و غیر صنعتی که به طرق مختلف وارد اکوسیستم ها می شوند .

Reference

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

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

3. Dorothy. M , Ames. B N , 1983, Revised methods for the salmonella mutagenicity test , Mutat.Res. 113 ,173-216.

4. Blackburn .GR , Deitch .RA , Schreiner .CA , Mehlman .MA , Mackerer .CR , 1984 , Estimation of the dermal carcinogenic activity of petroleum fractions using a modified Ames assay , Cell Bio Toxicol , Oct ; 1(1) , 67-80.

5. Spingarn. NE , 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.72 , 979-983 .

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

7. Pasquini.R , Taningher.M , Monarca.S , Pala.M , Angeli.G , 1989 , Chemical composition and genotoxic activity of petroleum derivatives collected in two working environments , Toxicol Environ Health , 27 (2) ; 225-238 .

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

9. Fluckiger S.I , Baumeister. M , Braun. K , Gervais.V , Hasler N. N , Remann. R , Van. J. G , Wundericg. H.G , Engeihardt. G , 2004 , Assessment of the performance of the Ames assay: a collaborative study with 19 coded compounds , Report of the International Collaborative Program , Progress in Mutation Research , vol 1 Elsevier , New York , 181-197.

10. Green .M , Muriel .w , 1976 , Mutagen testing using Trp+ reversion in Escherichia Coli ,Mutation Res, 38, 3-32.

11. Wakabayashi . K , Watanabe . T, Ohe . T , 2004 , Mutagens in surface water : a review , Mutasion Research 567 , 109-149 .

12. Krewski. D , Thomas. RD , 1992 , Carcinogenic mixtures , Mutation Research , vol 12, No.1.