Iranian Journal of Breast Diseases. 2023; 15(4):69-88.

Original Article

In Vitro Cytotoxic Effect of Biosurfactants Extracted from Bifidobacterium Species on MCF-7 and WRL68 Cell Lines

Batool Shakir Abed Almjalawi [1*], Amal Talib Al Sa'ady[2,3]

[1]Ministry of Education, Directorate General of Education in Karbala, Karbala, Iraq
[2]Medical Microbiology, College of Pharmacy/University of Babylon, Iraq
[3]Health Security Partners 2019(HSP) Fellow

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

Receive: 2022/09/26
Accepted: 2022/12/20

*Corresponding Author:
batool_shakir@karbala.edu.iq

Ethics Approval:
Not applicable

Abstract

Background: Biosurfactants are surface-active molecules which consist mainly of a hydrophobic and a hydrophilic part. Because of the amphoteric property of biosurfactants and differences in plasma membrane characteristics of cancer and normal cells, biosurfactants can exert specific anticancer effects. Hence, these compounds are proposed to be widely applied in the treatment of cancer.

Objective: Assessing the ability of *Bifidobacterium* species to synthesize biosurfactant compounds and evaluating the cytotoxicity of those compounds in the WRL68 normal cell line and the MCF-7 cell line.

Materials and Methods: *Bifidobacterium* species were isolated from milk samples from healthy women with normal pregnancy conditions. Women with mastitis were excluded. Biosurfactants were extracted and purified using ion exchange chromatography and cytotoxicity was assessed using the MTT assay.

Results: Four biosurfactant compounds were isolated, and the IC50 was measured for each compound. Each compound showed different cytotoxic activity toward MCF-7 and WRL68 cell lines. Compound no. 4 was coined to be the best choice among the others as it showed the most inhibitory effect on MCF-7 cells, with the lowest effect on normal cells.

Conclusion: Isolated *Bifidobacterium* species can produce at least 4 new biosurfactant compounds with varying activity and toxicity. One of these compounds exerts a specific antitumor effect on MCF-7 breast cancer cells. Although complementary studies are needed, the isolated biosurfactant can be used in combination with current modalities to increase the efficacy of treatment in breast cancer.

Keywords: Bifidobacterium, Biosurfactant, Antitumor, MCF-7, WRL68

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

Introduction

The antiadhesive activity of biosurfactants against pathogens has made them applicable in biomedical applications, such as gene transfection, antigen adjuvants, immunoglobulin-binding ligands, activators of fibrin clot lysis, inhibitors of fibrin clot formation, and antiadhesive biological coatings for prosthetic materials. Surfactin (lipopeptide) is the best-known and most studied biosurfactant. Recently, considerable attempts have been made to demonstrate its applicability in a variety of biomedical settings [1-4].

Because biosurfactants are so diverse, the scientific community's interest in finding novel molecules with intriguing antitumor properties and delving further into their mechanisms of action is growing all the time. The antitumor effect of biosurfactants produced by *Bifidobacterium* species was investigated in this study. The current study was an in vitro experiment that aimed to test the cytotoxic effect of biosurfactants extracted from *Bifidobacterium* species on both the MCF-7 cancer cell line and the WRL68 normal cell line.

Materials and methods

Samples collection

Breast milk samples were collected from healthy women who had a normal pregnancy. Women with mastitis were excluded. Fifty samples of breast milk were collected between 4-7 days after delivery and were cultured in two ways: (1) a part of the milk sample (without dilution) was transferred to the L-cysteine-MRS medium (de Man, Rogosa, and Sharpe medium), and then a loopful of culture was spread on the culture plate, using the streak plate method, to obtain single colonies; and (2) same as the previous technique, except that the samples were first diluted with 0.1% peptone water (prepared and sterilized according to the instructions of the manufacturer) before being transferred to the culture medium [5].

Identification

The bacteria were identified based on the phenotypic characteristics of the colonies from positive cultures, the microscopic characteristics of cells, and spore forming and sugar fermentation tests, and other biochemical tests, such as the KOH test, and catalase and oxidase tests [6, 7].

Assessing bacterial growth at different temperatures

We used the method developed by Buck and Gilliland [8]. Sterile MRS broth medium was distributed in 10 test tubes (5 ml per tube). The tubes were inoculated with a pure culture of an isolate of *Bifidobacterium* species and distributed into five groups, each group was incubated at a specific temperature (5, 15, 25, 35, and 45 °C) for 5 days. This procedure was used with each isolate of *Bifidobacterium* species. After the incubation, the ability of bacterial cultures to grow at these different temperatures was assessed by comparing the growth and density (in the form of turbidity and sediment) among the groups.

Testing the ability of *Bifidobacterium* species to produce biosurfactants

We used the oil diffusion method for this purpose. Distilled water (30 ml) was placed in a sterile petri dish, then 1 ml each of coconut oil and gingelly oil was added and placed in the center of the dish, then 20 µl of the bacterial culture (prepared in a 2-3-2 ratio) was added to the center. The biosurfactant-producing bacteria dislodged oils and spread in water [9].

Biosurfactant extraction from Bifidobacterium species

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69] [2023-01-28]

The method described by Rodrigues et al. and Almajlawi et al. [10, 11] was followed with modification. The L-cysteine-MRS broth medium was inoculated with pure isolates of *Bifidobacterium* species. The cultures were then incubated in anaerobic GasPak jars at 120 rpm for 48 h at 37 °C and then were centrifuged at 10,000 rpm for 30 min at 4 °C. The filtrate was discarded, and the precipitate was collected; then, the cells were washed twice with deionized water and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) at pH=7.0. The solution was kept at room temperature for 3-4 h while being stirred slowly to release the biosurfactant. Then, centrifugation was used to get rid of cell residues.

The solution was sterilized by filtering through a 0.22-µm Millipore membrane filter to obtain the biosurfactant. Iosurfactant compounds were dried using a lyophilizer, and the resultant powder was kept at 4 °C until use.

Biosurfactant cytotoxicity assessment

To investigate the possible cytotoxic effects of the compounds isolated from the bacteria, MCF-7 tumor cells and WRL68 normal cells were exposed to various doses of each biosurfactant.

Statistical Analysis

To determine whether group variance was significant, a one-way ANOVA (Duncan) was used; statistical significance was set at 0.05. GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) was utilized to analyze the data. Data were expressed as mean ± standard deviation.

Results

Isolation and identification of *Bifidobacterium* species

Under the microscope, cells were short rods, some of which were curved and others took the shape of the letter Y, and they were single or couples (Figure 1). They had the potential to grow at temperatures of 35 and 45 °C but were not able to grow at temperatures of 5, 10, 15, 20, 25, and 30 °C**Cytotoxic effects of compounds isolated from *Bifidobacterium* species in vitro**

In the present study, 4 biosurfactant compounds (numbered 1-4) were isolated via ion exchange chromatography. The IC50 was measured for each compound, and each compound showed different cytotoxic activity against MCF-7 and WRL68 cells.

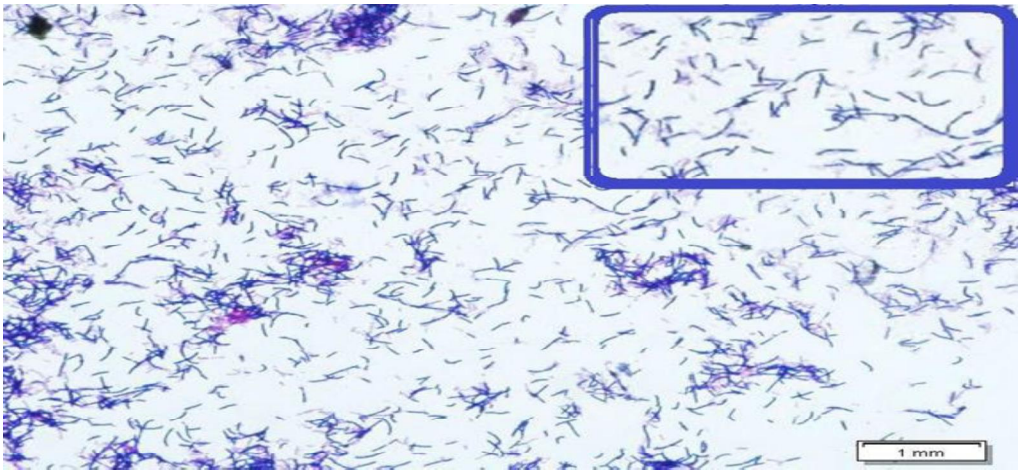


Figure 1: Bacteria of Bifidobacterium species under a light microscope (100 X) using Gram staining

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

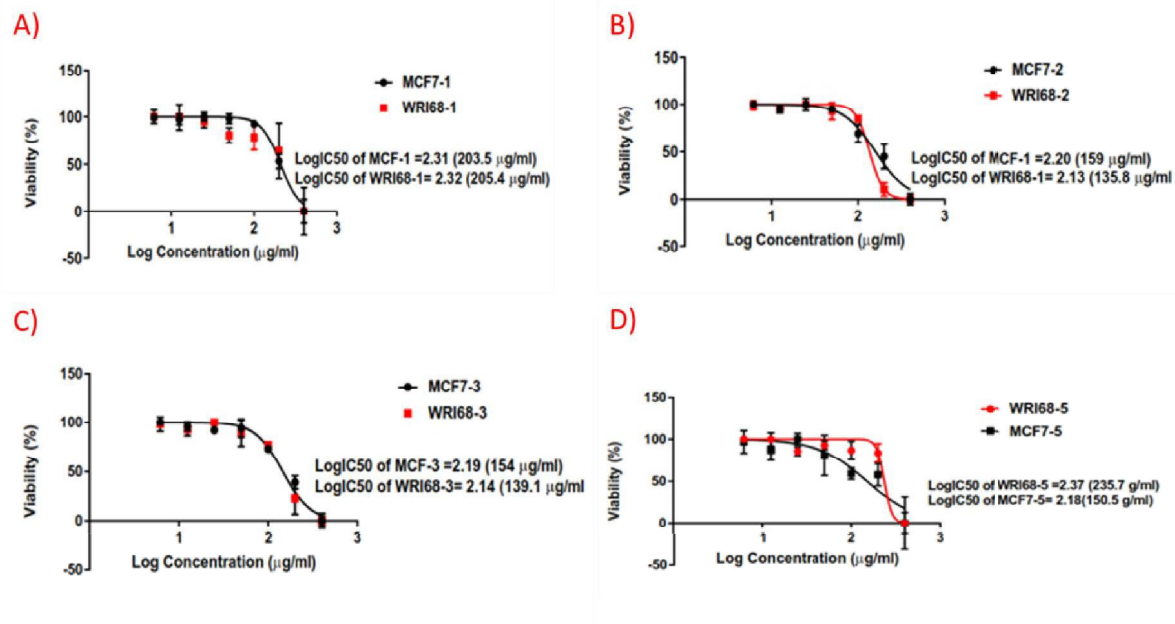


Figure 2: Cytotoxic effect of different compounds (No.1 to 4, depicted in sections A to D, respectively) assessed with the MTT assay

Discussion

Biosurfactants are a diverse group of compounds that consist of two distinct moieties: a hydrophobic one and a hydrophilic one (nonpolar and polar, respectively). To characterize biosurfactants, it is important to determine the hydrophilic-lipophilic balance [12], which determines the solubility of biosurfactants [13]. Low toxicity, biodegradability, wide application, high activity at various pH and temperature values, low production cost [14], and lower pathogenicity are among the main characteristics that make biosurfactants special in food and medicinal industries. Of course, it is necessary to produce it from safe and nonpathogenic organisms [15].

In the current study, we tried to assess the cytotoxic effects of biosurfactants on the MCF-7 cancer cell line and the WRL68 normal cell line. Among the isolated biosurfactants, No. 4 had an IC50 value of 150.5 µg/ml in MCF-7 cells, with no significant effect on WRL68 cells. In 2014, Duarte et al. [16] showed that biosurfactants have the potential to be used in the treatment of breast cancer. It was found in another study that the properties of biosurfactants can be beneficial in many medicinal settings. In that study, 5 synthetic biosurfactants from different sources were examined in terms of cytotoxicity. Results showed that cytotoxic activity was related to biosurfactants [13]. However, they did not examine the effect of biosurfactants on normal cell lines. Another study used a bacteriocin derived from *Lactococcus lactis* on breast cancer (MCF-7) and normal cell lines (WRL) [17]. It found a positive correlation between cytotoxic activity and concentration of the biosurfactants: where the concentration was high, the toxicity against normal cells increased.

Reports have shown that the biosurfactant surfactin can cause apoptosis in the mentioned cancerous cells via an ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway, such as the effect of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO121 on

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69] [2023-01-28]

the BCaP-37 breast cancer cell line, namely, inducing apoptosis in a dose-dependent way. Lipopeptide-induced changes in breast cancer cells' fatty acid content were linked to apoptosis. Many other lipopeptides (surfactin isoforms and fengycin) have also been shown to exhibit substantial cytotoxic effects against the HCT-15 and HT29 cell lines of human colon cancer [18].

Conclusion

The isolated *Bifidobacterium* species has the ability to produce at least 4 biosurfactant compounds varying in their activity and toxicity. Although the examined compounds showed good toxicity toward MCF-7 cancerous cells, more studies are needed before introducing them to clinics.

Conflicts of interest: none to declare.

Reffrences

1. Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. Lett Appl Microbiol. 2010; 50(4):419-24.
   doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02818.x.
2. Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by Lactobacillus paracasei. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 76(1): 298-304.
   doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.11.008.
3. Sen R. Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications. Adv Exp Med Biol. 2010; 672:316-23.
   doi: 10.1007/978-1-4419-5979-9_24.
4. Rodrigues LR. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. Adv Exp Med Biol. 2011; 715: 351-67.
   doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_22.
5. Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(4):965-9.
   doi: 10.1128/AEM.02063-08.
6. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey AF, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Vol. 3. 2009: Springer Science & Business Media.
7. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 2004: CRC press.
8. Buck LM, Gilliland SE. Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus acidophilus of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J Dairy Sci. 1994; 77(10):2925-33. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77233-7
9. Shaikh Rajesh A, Banani Ray Ch, Prajna M, Sisir R. Screening and characterization of biosurfactants producing microorganism formnatural environment (whey spilled soil). Journal of Natural Sciences Research. 2013; 3(13):53-9.
10. Rodrigues L, van der Mei H, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from Streptococcus thermophilus A. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 46(1): 107-12.
    doi:10.1111/j.1574-695X.2005.00006.x
    Abed Almjalawi BS, Alhamed TA. Almutteari AA. Antibacterial Activity of Biosurfactant extracted from Streptococcus thermophilus and Its effect on some Biochemical Parameters in Male Rats. Caspian Journal of Environmental Sciences, 2022; 20(1): 131-6.
    doi: 10.22124/cjes.2022.5407
11. Lang S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2002; 7(1-2): 12-20.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5] [DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5] [Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

12. Burgos-Díaz C, Martín-Venegas R, Martínez V, Storniolo CE, Teruel JA, et al. In vitro study of the cytotoxicity and antiproliferative effects of surfactants produced by Sphingobacterium detergens. Int J Pharm. 2013; 453(2): 433-40. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.06.029
13. Ghasemi A, Moosavi-Nasab M, Setoodeh P, Mesbahi G, Yousefi G. Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium Pediococcus dextrinicus SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization. 2020; 10(1): 1178. doi:10.1038/s41598-019-41589-0
14. Joshi S, Bharucha C, Jha S, Yadav S, Nerurkar A, Desai AJ. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Bioresour Technol. 2008; 99(1): 195-9. doi: 10.1016/j.biortech.2006.12.010.
15. Duarte C, Gudiña EJ, Lima CF, Rodrigues LR. Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells. AMB Express. 2014; 4:40. doi: 10.1186/s13568-014-0040-0.
16. Abbdul-Kaliq, M.T., K.H. Rasool, R.H. Essa, Effect of Crude Bacteriocin Isolated from Locally Lactococcus lactis on Cancer Cell Lines. Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology. 2020; 14(1):281-8. doi.org/10.37506/ijfmt.v14i1.57
17. Liu X, Tao X, Zou A, Yang S, Zhang L, Mu B. Effect of the microbial lipopeptide on tumor cell lines: apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane. Protein Cell. 2010; 1(6):584-94. doi: 10.1007/s13238-010-0072-4.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]

[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

فصلنامه بیماری های پستان ایران
۸۸-۶۹ :(٤)۱۵ ؛۱٤۰۱

مقاله پژوهشی

اثر سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی بیوسورفکتانت استخراج شده از بیفیدوباکتریوم بر روی لاین‌های سلولی MCF-7 و WRL68

بتول شاکر عبد المجلاوی[۱*]، امل طالب السعدی[۲،۳]

[۱]وزارت آموزش، اداره عمومی آموزش کربلا، کربلا، عراق
[۲]میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده داروسازی/دانشگاه بابل، عراق
[۳]موسسه شرکای امنیت سلامت (HSP)

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۷/۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۲۹

* نویسنده مسئول:
batool_shakir@karbala.edu.iq

چکیده

مقدمه: بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های فعال سطحی هستند که عمدتاً از دو بخش آبگریز و آب دوست تشکیل شده‌اند. با توجه به خاصیت آمفوتریک و ویژگی‌های مختلف غشای پلاسمایی سلول‌های طبیعی و سرطانی، می‌توانند اثرات ضد سرطانی خاصی داشته باشند. از این رو، این ترکیبات به‌طور گسترده در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان کاربرد دارند.

هدف: بررسی توانایی *Bifidobacterium spp.* برای سنتز بیوسورفکتانت و ارزیابی سمیت سلولی آن بر روی رده‌های سلولی نرمال WRL68 و سرطانی MCF-7.

مواد و روش‌ها: *Bifidobacterium spp.* از نمونه‌های شیر مادر از مادران سالم و شرایط بارداری طبیعی جدا شد و مادران مبتلا به ورم پستان از مطالعه خارج شدند. بیوسورفکتانت با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی استخراج و خالص‌سازی شد. در مجموع ۴ ترکیب شناسایی شد و سمیت سلولی در برابر رده سلولی سرطانی MCF-7 و رده سلولی نرمال WRL68 توسط MTT ارزیابی شد.

یافته‌ها: چهار ترکیب بیوسورفکتانت از طریق کروماتوگرافی تبادل یونی جدا شد، IC50 برای هر ترکیب اندازه‌گیری شد و هر ترکیب فعالیت سیتوتوکسیک متفاوتی به رده سلولی نرمال MCF-7 و WRL68 نشان داد. با توجه به نتایج، مشخص شد ترکیب شماره ۴ به عنوان بهترین انتخاب در میان سایرین دارد؛ زیرا بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی MCF-7 با کمترین اثر بر روی WRL68 نشان داد.

نتیجه‌گیری: گونه‌های بیفیدوباکتریوم جدا شده توانایی تولید حداقل چهار ترکیب بیوسورفکتانت جدید فعال و دارای سمیت سلولی را دارند. یکی از این ترکیبات فعالیت ضد توموری خاصی را علیه سلول‌های سرطان سینه MCF-7 اعمال می‌کند. اگرچه مطالعات تکمیلی موردنیاز است، به نظر می‌رسد بیوسورفکتانت جدا شده پتانسیل استفاده در کنار روش‌های رایج درمانی برای افزایش اثربخشی درمان در سرطان پستان را داراست.

کلمات کلیدی: بیفیدوباکتریوم spp، بیوسورفکتانت، ضد تومور، MCF-7، WRL68.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های فعال سطحی هستند که از طریق انواع میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شوند و می‌توانند در زمینه‌های مختلف زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار گیرند. بیوسورفکتانت‌ها از ساختارهای شیمیایی مختلفی از جمله گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها و لیپوپپتیدها تشکیل شده‌اند، بنابراین انتظار می‌رود که طیف گسترده ای از نقش‌ها و ویژگی‌های فیزیولوژیکی داشته باشند (۱-۵). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بیوسورفکتانت‌ها از طریق مکانیسم‌های متعددی فعالیت‌های ضدمیکروبی (ضد ویروسی و ضد باکتریایی) دارند که علیه پاتوژن‌های مختلف که باعث عفونت‌های واژن، مجاری ادراری و گوارشی می‌شوند، عمل می‌کنند (۶-۸). علاوه بر این، سورفکتانت‌های زیستی ممکن است از طریق اختلال و لیز غشاهای سلولی، تغییراتی در ساختار غشا ایجاد کنند که باعث افزایش نفوذپذیری غشاء می‌شود (۹، ۱۰)، یا باعث اختلال در ترکیبات پروتئینی که فعالیت‌های حیاتی غشاء را تغییر می‌دهد، شوند (۱۱-۱۳).

فعالیت ضد چسبندگی سورفکتانت‌های زیستی در برابر پاتوژن‌ها، آن‌ها را در کاربردهای زیست‌پزشکی مانند انتقال ژن، ادجوانت‌های آنتی‌ژن، لیگاندهای اتصال ایمونوگلوبولین، فعال‌کننده‌های لیز لخته فیبرین، مهارکننده‌های تشکیل لخته فیبرین، و ضد چسبندگی برای پوشش‌های بیولوژیکی قابل استفاده کرده است. مواد پروتز سورفاکتین (لیپوپپتید) شناخته شده‌ترین و مورد مطالعه ترین بیوسورفکتانت است. اخیراً، تلاش‌های قابل توجهی برای نشان دادن کاربرد آن در انواع رویکردهای زیست پزشکی انجام شده است (۳، ۱۴-۱۶).

از سوی دیگر، بیوسورفکتانت‌هایی که کمتر شناخته شده و توصیف شده‌اند، ممکن است مفیدتر باشند، به ویژه اگر طیف وسیعی از فعالیت‌ها را دارا بوده و برای استفاده در سلول‌های انسانی در نظر گرفته شوند، زیرا اکثر بیوسورفکتانت‌های تشخیص داده شده همولیتیک هستند. در مطالعه قبلی، لاکتوباسیلوس پاراکازی، یک باکتری پروبیوتیکی که ممکن است توسط سلول‌های انسانی مورد استفاده قرار گیرد، برای تولید یک سورفکتانت زیستی جدید استفاده شده است. بیوسورفکتانت شناسایی شده، به‌طور گسترده‌تری در همان مطالعه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بیوسورفکتانت‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۶ تا ۱۰ پایدار هستند. آنها کشش سطحی آب را از 72 mN/m به 41.8 mN/m کاهش می‌دهند و دارای غلظت حیاتی میسل 2.5mg/mL هستند (۱۴،۱۵) و مشخص گردید که از انواع گلیکوپروتئین‌ها هستند (۱۷).

این مطابق با ترکیب کلی بیوسورفکتانت‌هایی است که از باکتری‌های اسید لاکتیک مشتق شده‌اند (۱۸-۲۰). توانایی بیوسورفکتانت‌ها برای عمل به‌عنوان عوامل ضدتومور اخیراً آشکار شده است. لیپیدهای Mannosylerythritol، به‌عنوان مثالی از بیوسورفکتانت‌های گلیکولیپیدی، به‌عنوان بازدارنده برای تکثیر و توسعه سلول‌های لوسمی انسانی گزارش شده‌اند (۲۱-۲۳).

در حالی که بیوسورفکتانت سوکسینول ترهالوز لیپیدها می‌توانند سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک انسانی HL60 و رده سلولی لوسمی بازوفیلیک انسانی KU812 را مهار کرده و باعث تمایز در آنها شوند. علاوه بر این، بیوسورفکتانت سورفاکتین (و سایر لیپوپپتیدها) به عنوان عوامل ضد تومور در برابر انواع رده‌های سلولی سرطانی مانند رده سلولی سرطان روده بزرگ انسانی LoVo و سرکوب تکثیر سلول‌های سرطان سینه انسانی MCF-7 موثر بوده است (۲۴-۲۷). نشان داده شده است که لیپوپپتید از طریق القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی عملکرد بازدارنده رشد قابل توجهی دارد. سورفاکتین تکثیر سلول‌های MCF-7 سرطان سینه انسان را سرکوب می‌کند، البته این تأثیر وابسته به دوز می‌باشد (۲۸).

از آنجایی که بیوسورفکتانت‌های میکروبی بسیار متنوع هستند، علاقه جامعه علمی به یافتن مولکول‌های جدید با خواص ضد توموری جالب و کاوش بیشتر در مکانیسم‌های عمل آنها در حال افزایش است. اثر ضدتوموری یک بیوسورفکتانت تولید شده توسط گونه‌های بیفیدوباکتریوم

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]

در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه حاضر هدف اصلی ما بررسی اثر سیتوتوکسیک بیوسورفکتانت استخراج شده از گونه‌های بیفیدوباکتریوم در شرایط آزمایشگاهی، انجام شده است. جهت بررسی این مورد، تأثیر سمیت بیوسورفاکتانت‌های جدا شده بر رده‌های سلولی سرطانی MCF-7 و رده سلولی طبیعی WRL68 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

نمونه‌های شیر مادر از مادران سالم و شرایط بارداری طبیعی جمع‌آوری شد و مادران مبتلا به ورم پستان از مطالعه خارج شدند. ۵۰ نمونه شیر مادر بین ۴ تا ۷ روز پس از زایمان جمع‌آوری شد. ناحیه سینه چندین بار با آب و صابون شسته شد، پس از آن ابتدا فشار ملایمی اعمال شد تا تقریباً ۵۰۰ میکرولیتر شیر خارج شده و بیرون ریخته شد. سپس ۵۰۰-۷۰۰ میکرولیتر شیر در لوله‌های استریل جمع‌آوری شد و یک ساعت پس از جمع آوری به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها به روش کشت خطی با استفاده از یک لوپ کاملاً استریل کشت داده شدند.

جداسازی و شناسایی گونه‌های بیفیدوباکتریوم

نمونه‌های شیر به دو روش کشت داده شدند:

روش اول: بخشی از نمونه شیر (بدون رقت) توسط لوپ کاملاً استریل منتقل و روی محیط L-Cysteine-MRS (محیط De-Man، Rogosa و Sharpe) با استفاده از روش کشت خطی، کشت داده شد تا کلنی‌های منفرد بدست آید.

روش دوم: نمونه شیر با ۰/۱ درصد آب پپتون (طبق دستورالعمل سازنده تهیه و استریل شد) رقیق شد و قسمتی از شیر با محیط L-Cysteine -MRS و لوپ کاملاً استریل با استفاده از روش کشت خطی، کشت داده شد. سپس کلنی‌های منفرد به دست آمدند (۲۹).

در هر دو روش، ظروف با استفاده از ظرف بی‌هوازی و کیت تولید گاز (گاز پک) در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

تشخیص

پس از به‌دست آوردن کلنی‌های منفرد از موارد کشت مثبت، باکتری‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی کلنی‌ها، ویژگی‌های میکروسکوپی سلول‌ها و آزمایش‌های تشکیل هاگ و تخمیر قند و همچنین سایر آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند آزمون KOH، کاتالاز و آزمایشات تست اکسیداز تشخیص داده شدند (۳۰، ۳۱).

بررسی توانایی رشد باکتری در دماهای مختلف

برای این منظور از روش ذکر شده در (۳۲) استفاده گردید، یک محیط استریل مایع MRS در ۱۰ لوله آزمایش به‌صورت ۵ میلی‌لیتر در هر لوله توزیع شد. این لوله‌ها با کشت خالص یک کلنی کنفرد جدا شده از گونه‌های بیفیدوباکتریوم تلقیح شدند. و به پنج گروه تقسیم شدند و هر گروه در دمای مشخصی (۵، ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت پنج روز انکوبه شدند. این روش برای هر ایزوله از گونه‌های بیفیدوباکتریوم استفاده شد. پس از انکوباسیون، توانایی کشت‌های باکتریایی برای رشد در این دماهای مختلف با مقایسه تراکم رشد به‌دست آمده (به‌صورت کدورت و رسوب) مقایسه شد.

تهیه کشت باکتریایی *Bifidobacterium spp.*

برای این منظور از محیط استریل مایع MRS استفاده شد و در لوله‌های آزمایش (۵ میلی‌لیتر در هر لوله) توزیع شدند. این لوله‌ها با کشت خالص یک کلنی منفرد از گونه‌های بیفیدوباکتریوم تلقیح شده و در شرایط بی‌هوازی با استفاده از ظرف بی‌هوازی و کیت تولید گاز (گاز پک) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند (۳۳). این باکتری‌ها برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش توانایی Bifidobacterium spp برای تولید بیوسورفکتانت با روش انتشار روغن

۳۰ میلی لیتر آب مقطر در ظرف پتری استریل قرار داده شد، سپس ۱ میلی‌لیتر روغن نارگیل و روغن زنجبیل به آن اضافه شد و در وسط ظرف حاوی آب مقطر قرار گرفت. سپس ۲۰ میکرولیتر از کشت باکتریایی (تهیه شده در ۲-۳) در مرکز ظرف قرار داده شد، باکتری‌های تولید کننده

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]

بیوسورفکتانت روغن‌ها را جابجا کرده و در آب پخش کردند (۳۴).

استخراج بیوسورفکتانت از گونه‌های بیفیدوباکتریوم

برای این کار روش توصیف شده توسط (۳۵، ۳۶) با تغییراتی مورد استفاده قرار گرفت:

محیط مایع L-Cysteine-MRS با نمونه‌های جدا شده خالص بیفیدوباکتریوم تلقیح شد. کشت به صورت بی هوازی (ظروف بی هوازی با بسته گازی) با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و سانتریفیوژ خنک کننده در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. فیلتر دور انداخته شد و رسوب گرفته شد. سپس سلول‌ها دو بار با آب دیونیزه شسته شدند، سلول‌ها با بافر نمکی فسفاته (PBS) در pH=7.0 معلق شدند. محلول به مدت ۳-۴ ساعت در دمای اتاق با همزن تکان دهنده مغناطیسی بدون صدا نگهداری شد تا بیوسورفکتانت آزاد شود. سپس از سانتریفیوژ برای خلاص شدن از شر بقایای سلولی استفاده شد.

محلول با فیلتر کردن از طریق کاغذ صافی میلیپور ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد تا بیوسورفکتانت به دست آید. برای خشک کردن بیوسورفکتانت برای به دست آوردن پودر از لیوفیلیزر استفاده شد و سپس تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اثرات سیتوتوکسیک ترکیبات بیوسورفکتانت جدا شده از باکتری *Bifidobacterium Spp.* در شرایط آزمایشگاهی

اثرات سیتوتوکسیک ترکیبات جدا شده از بیوسورفاکتانت

به منظور بررسی اثرات احتمالی سیتوتوکسیک انواع ترکیباتی که از عصاره خام بیوسورفکتانت جدا شده اند، دو رده سلولی سرطانی MCF7 و نرمال WRL68 مورد استفاده قرار گرفتند.

نگهداری لاین‌های سلولی

هنگامی که سلول‌های کشت داده شده در فلاسک‌های کشت سلولی، تک لایه ای با تراکم مناسب پیدا کردند، پروتکل زیر انجام شد(۳۷):

الف- محیط کشن رویی دو ریخته شد و سلول‌ها با PBS شستشو شدند.

ب- دو تا سه میلی‌لیتر محلول تریپسین/ورسین به سلول اضافه شد. ظرف برگردانده شد تا تک لایه را با تکان دادن ملایم کاملاً بپوشاند. ظرف به مدت ۱ تا ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا زمانی که سلول‌ها از ظرف جدا شوند، انکوبه شدند.

ج- محیط کشت RPMI کامل تازه (۲۰-۱۵ میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها با پیپت کردن از کف فلاسک در محیط کشت پراکنده شدند.

D- سلول‌ها با تعداد مورد نیاز در ظروف کشت، فلاسک‌ها یا پلیت‌ها به هر میزان که لازم بود توزیع و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و 5% CO2 در انکوباتور انکوبه شدند.

غلظت سلولی با شمارش سلول‌ها با استفاده از هموسیتومتر و با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد:

تعداد کل سلول‌ها در هر میلی‌لیتر= تعداد سلول‌های شمارش شده×ضریب رقت × 10^4

روش انجام MTT

اثر سیتوتوکسیک ترکیبات مختلف جدا شده از عصاره‌های خام *Bifidobacterium spp* با استفاده از کیت آماده مصرف MTT طبق دستورالعمل سازنده مورد بررسی قرار گرفت:

محتویات کیت: محلول MTT و مایع محلول‌سازی

روش انجام:

• سلول‌های تومور ($1x10^4$ - $1x10^6$ سلول در هر میلی لیتر) در هر چاهک پلت ۹۶ خانه مسطح، در حجم نهایی ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت کامل رشد داده شدند. پلیت توسط پارافیلم استریل شده پوشانده شد و به آرامی تکان داده شد.

• پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]

• پس از انکوباسیون، محیط خارج شد و سری رقت‌های مورد نظر (۱۲،۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد.

• سه تکرار در هر غلظت و همچنین کنترل (سلول‌های تیمار شده با محیط بدون سرم) مورد استفاده قرار گرفت. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO2 به مدت۲۴ ساعت انکوبه شدند.

• پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های ذکر شده از بیوسورفاکتانت‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. پس از آن، این پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵٪ CO2 به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند.

• محیط‌ها با دقت برداشته شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع محلول سازی به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد.

میزان جذب با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۵ نانومتر تعیین شد. داده‌های چگالی نوری به منظور محاسبه غلظت ترکیبات مورد نیاز برای کاهش ۵۰ درصدی زنده‌مانی سلولی برای هر رده سلولی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

تحلیل آماری

برای تعیین اینکه آیا واریانس گروهی معنی‌دار است، از ANOVA یک طرفه (دانکن) استفاده شد. معنی‌داری آماری به‌صورت $p\ value \leq 0.05$ تعریف شد. جهت انجام محاسبات آماری از Graph Pad Prism v. 6.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA) استفاده شد و داده‌ها به‌عنوان میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده است.

نتایج

جمع آوری نمونه‌ها

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، از بین ۵۰ نمونه، تنها ۵ نمونه (۱۰٪) رشد باکتریایی مثبتی برای گونه‌های بیفیدوباکتریوم داشتند.

جداسازی و شناسایی گونه‌های بیفیدوباکتریوم

محیط L-Cysteine -MRS برای جداسازی گونه‌های بیفیدوباکتریوم مورد استفاده قرار گرفت. تشخیص بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی کلنی‌ها، مورفولوژی سلولی زیر میکروسکوپ، تشکیل اسپور و سایر آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام شد و سپس با ویژگی‌هایی که در منابع مرجع ثبت شده‌اند مقایسه گردید (۳۰، ۳۱). تنها ۱۰ درصد (۵ شیر از ۵۰ نمونه) از نمونه‌ها برای گونه‌های بیفیدوباکتریوم مثبت بودند. کلنی‌های کرم رنگ، محدب و دایره‌ای شکل جدا شدند (شکل۱). سلول‌ها در زیر میکروسکوپ به شکل میله‌های کوتاهی بودند که برخی از آن‌ها خمیده بوده و برخی دیگر شکل حرف Y داشتند، معمولاً به‌صورت منفرد یا زوج بودند (شکل ۲). آن‌ها پتانسیل رشد در دماهای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد را داشتند و قادر به رشد در دماهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ درجه سانتیگراد نبودند. نتایج آزمایشات تشخیصی و بیوشیمیایی در جدول ۱ نشان داده شده است.

آزمایش توانایی *Bifidobacterium spp.* برای تولید بیوسورفکتانت با روش انتشار روغن

روغن نارگیل و روغن زنجبیل برای آزمایش توانایی تولید بیوسورفکتانت استفاده شد (۳۸). نتایج نشان داد که هر پنج نمونه جداشده از گونه‌های بیفیدوباکتریوم این توانایی را داشتند (روش تعدیل شده برای استخراج بیوسورفکتانت از این باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت). پس از استخراج و جمع‌آوری بیوسورفاکتانت و خشک کردن آن با لیوفیلایزر پودر رسوب شده به رنگ سفید مایل به زرد (بیوسورفکتانت) به‌دست آمد (شکل ۳). این نتایج با سایر مطالعاتی که بیوسورفکتانت سفید رنگی را بدست آوردند مطابقت دارد (۳۸-۴۰).

اثر سیتوتوکسیک ترکیبات جدا شده از باکتری. *Bifidobacterium spp* در شرایط آزمایشگاهی

در مطالعه حاضر، چهار ترکیب بیوسورفکتانت (شماره ۱، شماره ۲، شماره ۳ و شماره ۴) از طریق کروماتوگرافی تبادل یونی جدا شد، IC50 برای هر ترکیب اندازه‌گیری شد و هر

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69] [2023-01-28]

ترکیب فعالیت سیتوتوکسیک متفاوتی را نسبت به رده سلولی MCF-7 و نرمال WRL68 نشان دادند.

همانطور که در شکل ۴ می‌بینیم، مقادیر log IC50 برای لاین سلولی MCF-7 به ترتیب ۲/۳۱، ۲/۲۰، ۲/۱۹ و ۲/۱۸ و برای WRL68 به ترتیب ۲/۳۲، ۲/۱۳، ۲/۱۴ و ۲/۳۷ برای ترکیبات شماره ۱، شماره ۲، شماره ۳ و شماره ۴ به‌دست آمد. مهم‌ترین نکته در بررسی تأثیر سمیت سلولی ترکیبات مورد استفاده برای درمان سرطان این است که دارو باید رده‌های سلولی سرطانی را مهار کند و در عین حال اثر کم یا بدون تأثیر بر روی رده سلولی طبیعی داشته باشد؛ لازم به ذکر است، هرچه این غلظت پایین‌تر باشد، ترکیب موردنظر پتانسیل بالاتری جهت استفاده در بالین را خواهد داشت. در مطالعه حاضر، در نتیجه مقایسه IC50 به‌دست آمده از ترکیبات مختلف در رده‌های سلولی سرطانی و نرمال، ترکیب شماره ۴ بهترین ترکیب برای مهار MCF-7 و با کمترین اثر بر روی رده سلولی طبیعی WRL68است. مقادیر IC50 برای رده‌های سلولی MCF-7 و WRL68 به ترتیب ۲/۱۸ و ۲/۳۷، غلظت‌ها به ترتیب ۱۵۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۲۳۵/۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود. این مقادیر نشان می‌دهد که غلظت ۱۵۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند رده سرطانی MCF-7 را بدون هیچ اثر قابل‌توجهی بر روی رده سلولی WRL68 طبیعی مهار کند.

جدول۱: تعداد و درصد *Bifidobacterium* spp. جداشده از شیر مادران سالم

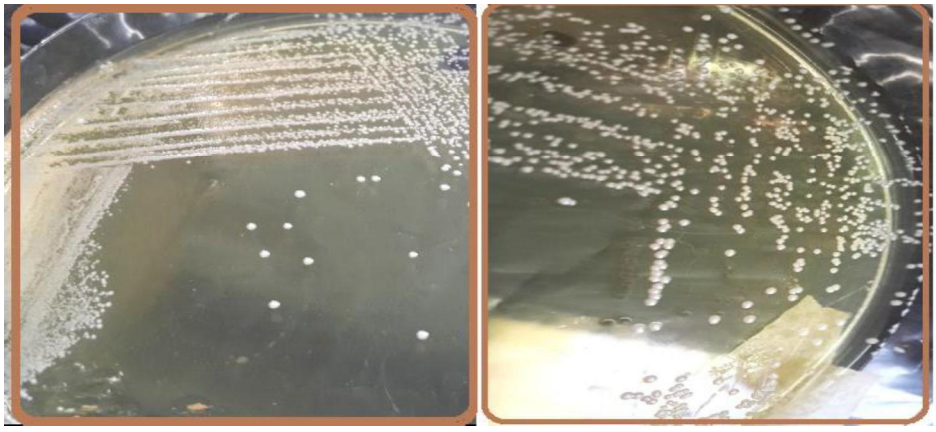
منبع	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت	درصد
human breast milk	۵۰	5	۱۰٪

جدول ۲: تست‌های تشخیصی و بیوشیمیایی برای Bifidobacterium spp. تهیه شده در این مطالعه

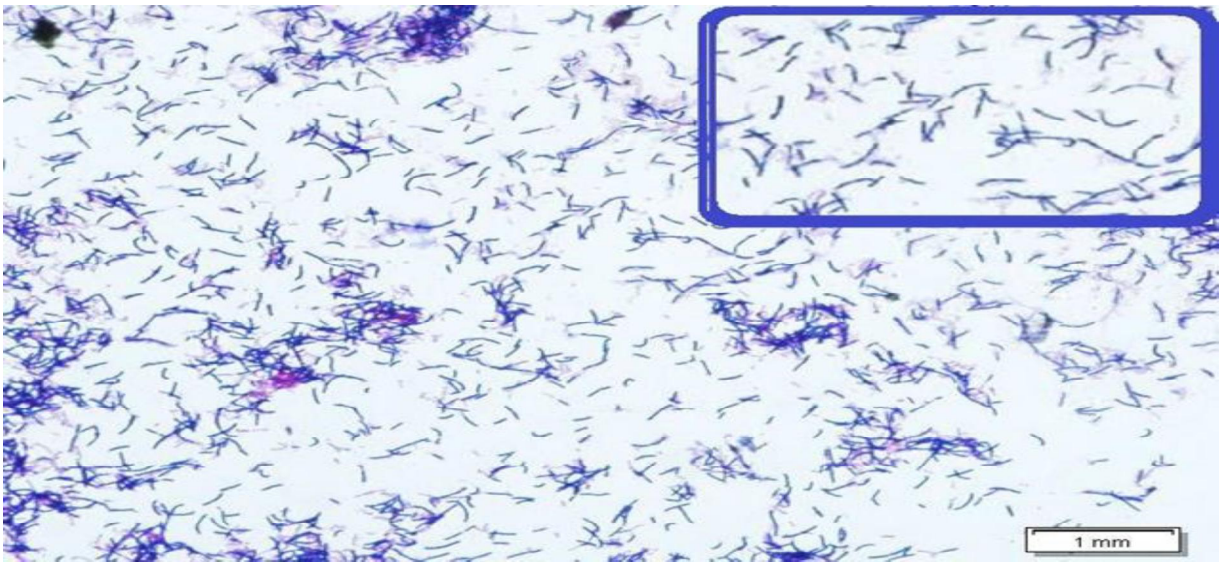
No.	The test	The result
1	Gram stain	Positive
2	Growth Aerobic	Negative
3	Anerobic Growth	Positive
4	Growth at 35°C and 45 °C	Positive
5	Growth at (5, 10, 15, 20, 25, 30) °C	Negative
6	Cellular Morphology	Rods, curved or shape of the letter `
7	Spore forming	Negative
8	KOH	Negative
9	Motility test	Negative
10	Catalase	Negative
11	Oxidase	Negative
12	Indole	Negative
13	Citrate Utilization	Negative
14	Gelatinase	Negative
15	Urease	Negative
16	Starch hydrolysis	Negative
17	Ammonia from arginine	Negative
18	Nitrate Reduction	Negative
19	Gas production	Negative
20	Gasein hydrolysis	Negative
21	Lecethinase	Negative
22	Lipase	Negative
23	**Sugar Fermentation:**	

Sugar	Glucose	Fructose	Galactose	Sucrose	Lactose	Mannose	Raffinose	Arabinose	Xylose	Maltose	Mannitol
Result	+	+	±	±	+	-	±	-	-	+	-

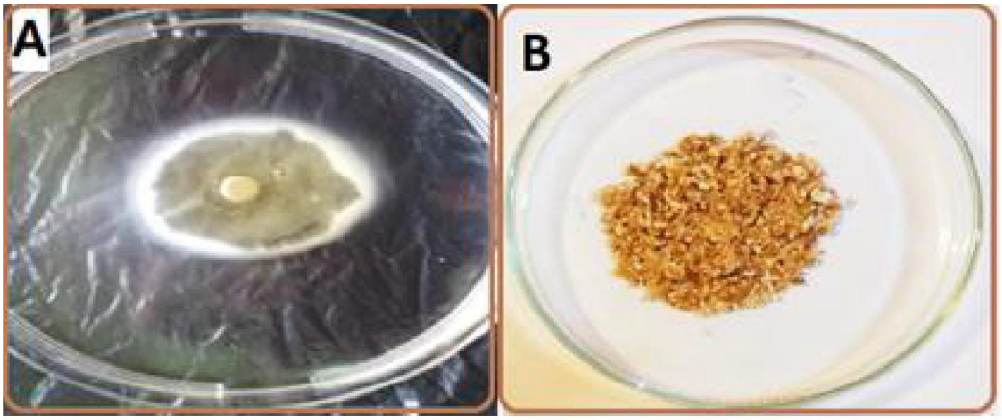
[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]



شکل ۱: تک کلنی‌های .Bifidobacterium spp به دست آمده در L- Cysteine-MRS آگار

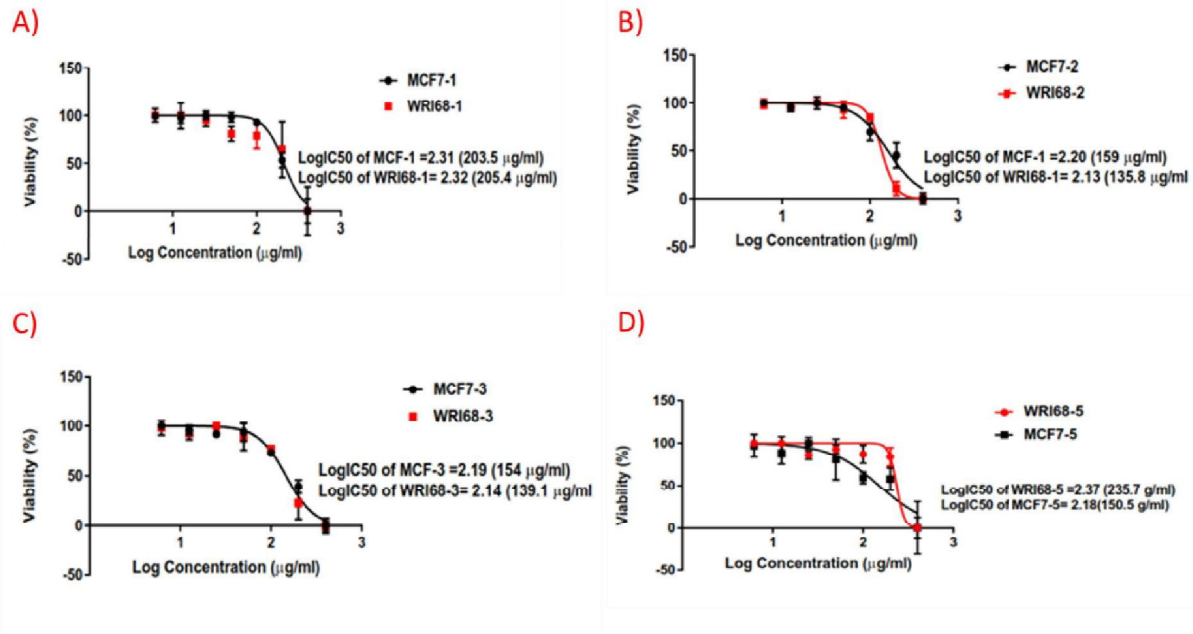


شکل ۲: سلول‌های .Bifidobacterium spp زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 100X، رنگ آمیزی شده با گرم



شکل ۳: توانایی .Bifidobacterium spp در تولید بیوسورفاکتانت: A) با استفاده تکنیک گسترش در روغن، B) بیوسورفاکتانت جداشده به رنگ زرد-سفید

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]



شکل ۴: تأثیر سمیت سلولی ترکیبات مختلف (شماره‌های ۱ تا ۴ به ترتیب A تا D) با استفاده از تست MTT

بحث

سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در بین زنان در سراسر جهان است. لاین‌های سلولی مختلفی ایجاد شده است تا امکان بررسی روش‌های درمانی مختلف در برابر این بیماری در شرایط آزمایشگاهی و درون‌تنی فراهم شود. در این راستا یکی از سلول‌های پرمصرف، رده سلولی MCF-7 است که زیرگروه مولکولی A از سرطان سینه است (۴۱). اگرچه تلاش‌های زیادی برای یافتن روش‌های کارآمد برای درمان این بیماری انجام شده است، اما نتایج هنوز آن‌طور که انتظار می‌رود نیست. و از این رو، معرفی یک رویکرد کارآمد با کمترین اثر بر روی سلول‌های طبیعی، یک نیاز مبرم به شمار می‌رود. بیوسورفاکتانت‌ها عوامل فعال سطحی هستند که معمولاً از عوامل بیولوژیکی مانند باکتری‌ها، مخمرها و آرکئی‌ها به دست می‌آیند. بیوسورفکتانت‌ها ممکن است خارج سلولی یا درون سلولی (به عنوان بخشی از دیواره سلولی) باشند. مکانیسم اصلی عمل آنها شامل کاهش کشش سطحی بین دو سطح غیرقابل اختلاط (IFT) و کشش سطحی (ST) است (۴۲، ۴۳). بیوسورفاکتانت‌ها کاربردهای گسترده‌ای در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و غذایی دارند (۴۴-۴۶). با این‌حال، در سال ۲۰۱۳، بورگوس دیاز و همکارانش (۴۷) متوجه شدند که بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط اسفنگوباکتریوم می‌توانند آپوپتوز را تحریک کنند و می‌توانند تکثیر سلول‌ها را کاهش دهند و می‌توانند اثر سیتوتوکسیک را کاهش داده و به همین خاطر به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی استفاده شوند. این موضوع در سال ۲۰۱۷ توسط پاتواری و همکارانش تأیید شد (۴۸). هدف اصلی ما در این مطالعه جداسازی بیوسورفاکتانت از نمونه‌های شیر مادران سالم، به‌منظور بررسی توانمندی سمیت سلولی آنها در مقابل سلول‌های سرطانی MCF-7 بود.

در میان نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده، مشخص گردید تنها ۱۰ درصد آنها دارای گونه‌های بیفیدوباکتریوم هستند. این نتایج با (۴۹) مطابقت دارد اما کمتر از یافته‌های گزارش شده در مطالعات دیگر، (۲۹) ۸ از ۲۳ نمونه (۳۴/۸٪) جداسازی شد، در حالی که، (۵۰) تنها ۴۱ از ۱۶۰ نمونه (۲۵/۶۲٪) شیر مادر شناسایی شده توسط PCR جداسازی شد. Bifidobacterium spp. یکی از باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) است که نشان‌دهنده بیوسورفکتانت‌های زیست تخریب‌پذیر (BSs) است که به دلیل زیست فعال بودن آن به‌عنوان یک مولکول دارای فعالیت سطحی،

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]

کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی دارد. این زیست فعالی نسبت به رشد بیوفیلم‌های خاصی که باعث تشکیل پاتوژن‌ها می‌شوند در سال ۲۰۱۶ توسط شارما و ساهاران نشان داده شده است (۵۱). با این حال، بسیاری از مطالعات انجام شد که فعالیت زیستی BSs تهیه شده از LAB را گزارش می‌کند؛ تمامی این مطالعات، زیست فعال بودن آن را در مهار رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها تأیید می‌کنند (۱۳، ۱۴، ۵۲).

بیوسورفکتانت‌ها دارای یک گروه فعال هستند که مواد خاصی را آزاد می‌کنند. این ترکیبات متنوع بوده و از دو گروه متمایز آبگریز و آب دوست (به ترتیب غیرقطبی و قطبی) تشکیل شده‌اند. برای مشخص کردن بیوسورفکتانت‌ها، تعیین HLB (تعادل لیپوفیل هموفیلیک) (۵۳) مهم است، این مورد توانایی حلالیت بیوسورفاکتانت‌ها را تعیین کرده و با آن نسبت مستقیم دارد (۴۷). سمیت کم، زیست تخریب‌پذیری، کاربرد وسیع، فعالیت بالا در pH و دماهای مختلف و هزینه تولید پایین (۵۴) به‌منظور جلوگیری از مشکلات و احتمال بیماری‌زایی، از جمله ویژگی‌های اصلی است که باعث می‌شود BSها به ویژه در صنایع غذایی و دارویی کاربرد داشته باشند؛ البته تولید آن از موجودات بی‌خطر و غیر بیماری زا ضروری است (۵۵).

در مطالعه حاضر، ما سعی کردیم اثر سیتوتوکسیک بیوسورفکتانت را بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7 و همچنین بر روی رده سلولی نرمال WRL68 ارزیابی کنیم. در میان بیوسورفکتانت جدا شده، مشخص گردید، نمونه شماره ۴ دارای IC50 در غلظت ۱۵۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در MCF-7 است، بدون اینکه تأثیر قابل‌توجهی بر WRL68 داشته باشد. در سال ۲۰۱۴، دوارت و همکارش (۵۶) نشان دادند که بیوسورفاکتانت‌ها مولکول‌های امیدوارکننده‌ای هستند که به‌دلیل سطح فعال‌شان می‌توانند به‌عنوان عامل ضدسرطان، به‌ویژه در درمان سرطان سینه مورد استفاده قرار گیرند. در مطالعه دیگری مشخص گردید، می‌توان از این مولکول‌ها در بسیاری از اهداف زیست پزشکی استفاده کرد؛ در این تحقیق پنج بیوسورفکتانت سنتز شده از منابع مختلف مورد بررسی قرار گرفت، سمیت سلولی تمام این پنج سورفکتانت مورد آزمایش واقع شد. نتایج به‌دست آمده نشان دادند که فعالیت سیتوتوکسیک با غلظت بیوسورفکتانت مرتبط است (۴۷). با این حال، این مطالعه اثر بیوسورفکتانت‌ها را بر روی رده‌های سلولی طبیعی مورد مطالعه قرار نداده است. مطالعه دیگری با استفاده از باکتریوسین مشتق شده از لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی سرطان سینه (MCF-7) و رده سلولی طبیعی کبد (WRL) انجام شد (۵۷). یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که ارتباط مهمی بین فعالیت سیتوتوکسیک و غلظت وجود دارد و غلظت‌های بالا دارای سمیت معنی‌داری بر رده‌های سلولی طبیعی کبد هستند.

بسیاری از مطالعات نشان نشان داده‌اند که بیوسورفکتانت (سورفاکتین) می‌تواند از طریق مسیر میتوکندری/ کاسپاز با واسطه ROS/JNK باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی اشاره شده شوند؛ از این جمله می‌توان به اثرات بیوسورفکتانت تولید شده توسط Bacillus subtilis، لیپوپپتید HSO121، بر روی Bcap37 رده‌های سلولی سرطان سینه اشاره کرد، که آپوپتوز را به روشی وابسته به دوز افزایش می‌دهند. تغییرات ناشی از لیپوپپتید در محتوای اسیدهای چرب سلولی رده‌های سلولی سرطان سینه با آپوپتوز مرتبط بوده است. بسیاری از لیپوپپتیدهای دیگر (ایزوفرم‌های سورفاکتین و فنزیسین) نیز اثرات سیتوتوکسیک قابل‌توجهی را علیه رده‌های سلولی HCT15 و HT29 سرطان روده بزرگ انسانی نشان می‌دهند (۲۶).

نتیجه‌گیری

گونه‌های بیفیدوباکتریوم جدا شده توانایی تولید حداقل چهار ترکیب بیوسورفکتانت جدید را دارند که از نظر فعالیت و سمیت متفاوت هستند. اگرچه ترکیب مورد بررسی سمیت خوبی را نسبت به سلول‌های سرطانی MCF-7 نشان داد، قبل از معرفی آنها به کلینیک‌ها به مطالعات بیشتری نیاز است. شناسایی و بررسی دقیق‌تر این چهار ترکیب برای مشخص کردن فرمول شیمیایی و ترکیبات

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]

تشکیل دهنده این ترکیبات و تجزیه و تحلیل تفاوت‌های آنها، توصیه می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اظهار می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی در ارتباط با این مقاله ندارند.

References

1. Gudiña EJ, Rangarajan V, Sen R, Rodrigues LR. Potential therapeutic applications of biosurfactants. Trends Pharmacol Sci. 2013; 34(12): 667-75.
   doi: 10.1016/j.tips.2013. 10.002.
2. Lígia Rodrigues, Ibrahim M. Banat, José Teixeira, Rosário Oliveira, Biosurfactants: potential applications in medicine, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006; 57(4): 609-18. doi.org/10.1093/jac/dkl024
3. Rodrigues LR. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. Adv Exp Med Biol. 2011; 715:351-67.
   doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_22.
4. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 87(2):427-44.
   Doi: 10.1007/s00253-010-2589-0.
5. Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends Biotechnol. 2004; 22(3):142-6. doi: 10.1016/j.tibtech.2004 .01.010.
6. Velraeds MM, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a Lactobacillus acidophilus biosurfactant. J Med Microbiol. 1998; 47(12):1081-5.
   doi: 10. 1099/00222615-47-12-1081.
7. Mireles, J.R., A. Toguchi, R.M. Harshey, Salmonella enterica serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. Journal of bacteriology. 2001; 183(20): 5848-54.
8. Rivardo F, Turner RJ, Allegrone G, Ceri H, Martinotti MG. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by Bacillus spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 83(3):541-53.
   doi: 10.1007/ s00253-009-1987-7.
9. Heerklotz H, Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. Eur Biophys J. 2007; 36(4-5):305-14. doi: 10.1007/s00249-006-0091-5.
10. Jin Hwan Lee, Sang Hae Nam, Weon Taek Seo, Han Dae Yun, Su Young Hong, Min Keun Kim, et al., The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic Bacillus subtilis CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. Food Chemistry. 2012; 131(4): 1347-54.
11. Ortiz A, Teruel JA, Espuny MJ, Marqués A, Manresa A, Aranda FJ. Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. Chem Phys Lipids. 2009;158(1):46-53.
    doi: 10.1016/j. chemphyslip.2008.11.001
12. Sánchez M, Aranda FJ, Teruel JA, Espuny MJ, Marqués A, Manresa A, Ortiz A. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by Pseudomonas aeruginosa. J Colloid Interface Sci. 2010; 341(2):240-7. doi: 10.1016/j.jcis.2009.09.042.
13. Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, et al., Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by Rhodococcus sp. Langmuir. 2009; 25(14): 7892-8. doi: 10.1021/la900480q.
14. Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.69]

paracasei ssp. paracasei A20. Lett Appl Microbiol. 2010; 50(4):419-24.
doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02818.x.

15. Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by Lactobacillus paracasei. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 76(1):298-304.
doi: 10.1016/j.colsurfb. 2009.11.008.
16. Sen R. Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications. Adv Exp Med Biol. 2010; 672:316-23.
doi: 10.1007/978-1-4419-5979-9_24.
17. Pinto S, Alves P, Santos A.C, Matos C.M, Oliveiros B, Gonçalves S, et al., Poly (dimethyl siloxane) surface modification with biosurfactants isolated from probiotic strains. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2011; 98(4): 535-43.
18. Brzozowski B, Bednarski W, Gołek P. The Adhesive Capability of Two Lactobacillus Strains and Physicochemical Properties of Their Synthesized Biosurfactants. Food Technology and Biotechnology. 2011; 49 (2): 177-86.
19. Madhu AN, Prapulla SG. Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by Lactobacillus plantarum CFR 2194. Appl Biochem Biotechnol. 2014; 172(4): 1777-89.
doi: 10.1007/s12010-013-0649-5.
20. Moldes AB, Paradelo R, Vecino X, Cruz JM, Gudiña E, Rodrigues L, et al., Partial characterization of biosurfactant from Lactobacillus pentosus and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. Biomed Res Int. 2013; 2013:961842.
doi: 10.1155/2013/961842.
Fracchia L, Cavallo M, Giovanna M, M. I. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. Biomedical Science, Engineering and Technology. 2012.
doi: 10.5772/23821
21. Zhao X, Wakamatsu Y, Shibahara M, Nomura N, Geltinger C, Nakahara T, et al., Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. Cancer Res. 1999; 59(2):482-6
22. Isoda H, Nakahara T. Mannosylerythritol lipid induces granulocytic differentiation and inhibits the tyrosine phosphorylation of human myelogenous leukemia cell line K562. Cytotechnology. 1997; 25(1-3):191-5.
doi:10. 1023/A:1007982909932.
23. Sudo T, Zhao X, Wakamatsu Y, Shibahara M, Nomura N, Nakahara T, et al., Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. Cytotechnology. 2000; 33(1-3): 259-64. doi: 10.1023/A: 1008137817944.
24. Isoda H, Shinmoto H, Matsumura M, Nakahara T. Succinoyl trehalose lipid induced differentiation of human monocytoid leukemic cell line U937 into monocyte-macrophages. Cytotechnology. 1995-1996; 19(1):79-88. doi: 10.1007/BF00749758.
25. Liu X, Tao X, Zou A, Yang S, Zhang L, Mu B. Effect of the microbial lipopeptide on tumor cell lines: apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane. Protein Cell. 2010;1(6):584-94. doi: 10.1007/s13238-010-0072-4.
26. Sivapathasekaran C, Das P, Mukherjee S, Saravanakumar J, Mandal M, Sen R. Marine Bacterium Derived Lipopeptides: Characterization and Cytotoxic Activity Against Cancer Cell Lines. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2010;16(4): 215-22.
doi.org/10.1007/s10989-010-9212-1.
27. Kim SY, Kim JY, Kim SH, Bae HJ, Yi H, Yoon SH, et al., Surfactin from Bacillus subtilis displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. FEBS Lett. 2007;581(5):865-71.
doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.059.
28. Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, et al,. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 2009;75(4): 965-9. doi: 10.1128/AEM.02063-08.
29. Vos P, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Vol. 3. 2011: Springer Science & Business Media.
30. Atlas RM. Handbook of microbiological media. 2004: CRC press.
31. Buck LM, Gilliland SE. Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus acidophilus of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J Dairy Sci. 1994; 77(10):2925.
doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77233-7.
32. Ghazal Aziz, Hafiz Fakhar, Sajjad ur Rahman, Muhammad Tariq, Arsalan Zaidi. An assessment of the aggregation and probiotic characteristics of Lactobacillus species

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[DOI: 10.29252/ijbd.15.4.69] [2023-01-28]

isolated from native (desi) chicken gut, Journal of Applied Poultry Research. 2019; 28(4): 846-57.

33. Ali S.R., Chowdhury B.R., Mondal P Rajak S. Screening and characterization of biosurfactants producing microorganism formnatural environment (whey spilled soil). Screening. 2013; 3(13):53-8.
34. Rodrigues L, van der Mei H, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from Streptococcus thermophilus A. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;46(1):107-12.
doi:10.1111/j.1574-695X.2005.00006.x
35. Abed Almjalawi, B.S., T.A. Alhamed, A.A. Almutteari. Antibacterial Activity of Biosurfactant extracted from Streptococcus thermophilus and Its effect on some Biochemical Parameters in Male Rats. Caspian Journal of Environmental Sciences. 2022; 20(1): 131-6.
36. Frank D.A., Culture of animal cells: a manual of basic technique. The Yale Journal of Biology and Medicine. 1984; 57(2): 247.
37. Salleh SM, Noh NAM, Yahya ARM. Improving Biosurfactant Recovery from Pseudomonas aeruginosa Fermentation. In: Carpi, A. , editor. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering- From Analysis and Modeling to Technology Applications. London: IntechOpen; 2011:577-86. doi: 10.5772/23395
38. Adejumo SA, Oli AN, Okoye EI, Nwakile CD, Ojiako CM, Okezie UM, et al., Biosurfactant Production Using Mutant Strains of Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis from Agro-industrial Wastes. Adv Pharm Bull. 2021;11(3):543-56.
doi: 10.34172/apb.2021. 063.
39. Nayarisseri A, Singh P, Singh SK. Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing Bacillus subtilis strain ANSKLAB03. Bioinformation. 2018; 14(6): 304-14. doi:10.6026/97320630014304
40. Comşa Ş., A.M. Cimpean, M Raica, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. Anticancer research. 2015; 35(6): 3147-54.
41. Mulligan C.N., Environmental applications for biosurfactants. Environmental pollution. 2005; 133(2): 183-98.
42. Shahaliyan F, Safahieh A, Abyar H. Evaluation of emulsification index in marine bacteria Pseudomonas sp. and Bacillus sp. Arabian Journal for Science and Engineering. 2015; 40(7):1849-54.
43. M. Rincón-Fontán, L. Rodríguez-López, X. Vecino, J.M. Cruz, A.B. Moldes. Design and characterization of greener sunscreen formulations based on mica powder and a biosurfactant extract. Powder technology. 2018; 327: 442-8.
44. López-Prieto A, Rodríguez-López L, Rincón-Fontán M, Moldes AB, Cruz JM, Effect of biosurfactant extract obtained from the corn-milling industry on probiotic bacteria in drinkable yogurt. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019; 99(2): 824-30.
45. Mahakalkar A, Hatwar B, Biophysicochemical characteristics & applications of nanoparticles: mini review. American Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2014; 1: 035-41.
46. Burgos-Díaz C, Martín-Venegas R, Martínez V, Storniolo CE, Teruel JA, Aranda FJ, et al., In vitro study of the cytotoxicity and antiproliferative effects of surfactants produced by Sphingobacterium detergens. International journal of pharmaceutics. 2013; 453(2): 433-40.
47. Patowary K, Patowary R, Kalita MC, Deka S. Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. Frontiers in microbiology. 2017; 8: 279.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00279
48. Karami S, Roayaei M, Hamzavi H, Bahmani M, Hassanzad-Azar H, Leila M, et al,. Isolation and identification of probiotic Lactobacillus from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. Int J Pharm Investig. 2017; 7(3): 137-41. doi: 10.4103/jphi.JPHI-8 -17.
49. Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014; 59(1): 78-88.
doi: 10.1097/ MPG.0000000000000347.
50. Sharma D, Saharan BS. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by Lactobacillus helveticus. Biotechnol Rep (Amst). 2016; 11: 27-35. doi: 10.1016/j.btre.2016.05. 001.
51. Sambanthamoorthy K, Feng X, Patel R, Patel S, Paranavitana C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. BMC Microbiol. 2014;14:197.
doi: 10.1186/1471-2180-14-197.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

52. Lang S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2002; 7(1-2):12-20.

53. Ghasemi A, Moosavi-Nasab M, Setoodeh P, Mesbahi G, Yousefi G. Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium Pediococcus dextrinicus SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization. Sci Rep. 2019; 9(1):5287.
doi: 10.1038/s41598-019-41589-0.

54. Joshi S, Bharucha C, Jha S, Yadav S, Nerurkar A, Desai AJ. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Bioresour Technol. 2008; 99(1): 195-9. doi: 10.1016/j.biortech. 2006.12.010.

55. Duarte C, Gudiña EJ, Lima CF, Rodrigues LR. Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells. AMB Express. 2014; 4:40.
doi: 10.1186/s13568-014-0040-0.

56. Abbdul-Kaliq M.T., K.H. Rasool, R.H. Essa, Effect of Crude Bacteriocin Isolated from Locally Lactococcus lactis on Cancer Cell Lines. Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology. 2020; 14(1):281-8.
doi.org/10.37506/ijfmt.v14i1.57

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.5.5]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]