ارزیابی خصوصیات ضدباکتریایی همولنف دوکفه‌ای‌های *Cerastoderma* و *Didacna* سواحل جنوبی دریای خزر

- **محدثه صلواتی‌خوشقلب**: گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
- **اعظم مشفق***: گروه زیست‌شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
- **محبوبه سترکی**: گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

چکیده

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی خصوصیات ضدباکتریایی همولنف دوکفه‌ای‌های *Cerastoderma* و *Didacna* سواحل جنوبی دریای خزر بود. برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی اولیه از روش انتشار دیسک در آگار، ماکرودایلوشن و میکرودایلوشن و برای انتخاب درصد غلظت عصاره‌ها، از رقت‌های مختلف ۲۵٪، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶ درصد استفاده شد. بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در رقت‌های مختلف از همولنف دوکفه‌ای‌ها بر علیه باکتری *Escherichia coli* (ATC C25922) در دوکفه‌ای *Cerastoderma* مربوط به غلظت‌های ۲۵٪ و ۱/۵۶ و در دوکفه‌ای *Didacna* مربوط به غلظت‌های ۲۵٪ و ۳/۱۲۵ بود. هم‌چنین در باکتری *Klebsiella pnuemoniae* (NCTC5056) بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در همولنف دوکفه‌ای *Cerastoderma* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵٪ و ۳/۱۲۵ و در دوکفه‌ای Didacna مربوط به غلظت‌های ۲۵٪ و ۳/۱۲۵ بود. در باکتری *Entroccus faccium* بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در دوکفه‌ای *Cerastoderma* مربوط به غلظت‌های ۲۵٪ و ۳/۱۲۵ و در دوکفه‌ای *Didacna* مربوط به غلظت‌های ۲۵٪ و ۱/۵۶ بود. با افزایش غلظت همولنف، فعالیت ضدباکتری آن به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (p<۰/۰۵). همولنف صدف *Didacna* دارای MIC پایین‌تری در مقایسه با صدف *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های *E. coli* و *K. pnuemoniae* بود اما میزان MIC همولنف صدف *Cerastoderma* در مقایسه با صدف *Didacna* بر علیه باکتری *Entroccus faccium* کم‌تر بود (p<۰/۰۵). بنابراین با توجه به یافته‌های این پژوهش *Cerastoderma* و *Didacna* می‌تواند به‌عنوان منبعی با ترکیباتی‌با ارزش و دارای توان زیست فعالی در تهیه داروهای ضدمیکروبی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ماکرودایلوشن، میکرودایلوشن، ضدباکتری، همولنف، *Cerastoderma*، *Didacna*

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: moshfeghazam@gmail.com

مقدمه

در سالیان اخیر مطالعات فراوانی به‌منظور شناسایی و معرفی ترکیبات ضدمیکروبی جدید از منابع طبیعی افزایش یافته است (Marshall و Arenas، ۲۰۰۳). اغلب موجودات دریایی، ساختارها، مسیرهای متابولیکی، سیستم‌های تکثیر و مکانیزم‌های احساسی و دفاعی منحصر به‌فردی دارند که علت بروز این ویژگی‌های منحصر به‌فرد، زندگی در طیف وسیعی از شرایط محیطی مانند آب‌های سرد قطبی، فشار بسیار زیاد اعماق اقیانوس‌ها، شوری‌های مختلف، شرایط نوری و تاریکی مختلف و ... است (Sperstad، ۲۰۱۱). این موجودات متابولیت‌های بیواکتیو را در پاسخ به این فشارها برای محافظت از خود تولید می‌کنند. هم‌چنین در محیط زیست دریایی موجودات چسبنده و غیرمتحرک با تهدید اشغال فضا توسط سایرین مواجه هستند و در نتیجه با تولید ترکیبات ضدمیکروبی قلمرو خود را حفظ می‌کنند (Falanga، ۲۰۱۶؛ Sperstad، ۲۰۱۱؛ Tincu و Taylor، ۲۰۰۴). تراکم باکتری‌ها در بدن دوکفه‌ای‌ها بیش‌تر از آب دریای اطراف‌شان می‌باشد و این تراکم بالا در صورت بیماریزا بودن آن‌ها می‌تواند کشنده باشد. دوکفه‌ای‌ها برای حفاظت در برابر میکروارگانیسم‌ها به سیستم‌های دفاع سلولی (فاگوسیتوز، انکپسوله‌سازی) و هومورال (لکتین، آگلوتینین، آنزیم‌های لیزوزومال و فاکتورهای ضدمیکروبی) وابسته هستند (Canesi، ۲۰۰۲). بنابراین نرم‌تنان دریایی مانند صدف‌های دوکفه‌ای، منبع با ارزشی از ترکیبات ضدمیکروب ارائه می‌کنند. در این زمینه مطالعات بسیار زیادی بر روی منابع خشکی‌زی و دریازی انجام شده است. مطالعات متعدد نشان داده است که منابع دریایی مختلف، از قدرت ضدویروسی، ضدقارچی و ضدباکتریایی بسیار خوبی برخوردارند (Manivannan، ۲۰۱۱). باتوجه به این‌که زندگی در دریا سابقه بیش‌تری نسبت به زندگی در خشکی دارد آبزیان فرصت بیش‌تری برای تکامل در خود برای مواجهه با شرایط گوناگون داشته‌اند، از این‌رو به‌نظر می‌رسد این موجودات به‌ویژه گونه‌های کم تحرک‌تر می‌توانند حاوی ترکیبات مفید مانند انواع پپتیدهای ضدمیکروبی باشند (Malve، ۲۰۱۶). تاکنون در رابطه با خصوصیات ضدمیکروبی ترکیبات بدن نرم‌تنان، مانند صدف‌های دوکفه‌ای که در سواحل دریای خزر به فراوانی یافت می‌شوند، مطالعات محدودی انجام شده است (منظور از مطالعات محدود از نرم‌تنان سواحل خزر می‌باشد). صدف‌های Cerastoderma و Didacna تراکم بالایی در سواحل جنوبی دریای خزر دارند و نقش مهمی به‌عنوان یک منبع غذایی، برای سخت‌پوستان، ماهی و پرندگان آبچر ایفا می‌نمایند. با توجه به حجم انبوه مطالعات بر روی نرم‌تنان خلیج‌فارس و در مقابل مطالعات اندک بر روی نرم‌تنان سواحل شمالی، هدف از مطالعه حاضر، بررسی خصوصیات ضدباکتریایی همولنف دو کفه‌ای‌های *Cerastoderma* و *Didacna* سواحل جنوبی دریای خزر بود. مطالعه خصوصیات ضدباکتریایی این ترکیبات و هم‌چنین شناسایی و جداسازی آن‌ها زمینه تحقیقات وسیعی را در زمینه معرفی ترکیبات ضدمیکروب طبیعی جدید برای کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی، دارویی و آبزی‌پروری فراهم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری دوکفه‌ای و تهیه همولنف: تعداد ۳۰ صدف *Cerastoderma* (۲/۷±۰/۱ سانتی‌متر) و ۲۵ عدد صدف *Didacna* (۳/۵±۰/۱ سانتی‌متر) از نواحی جنوبی دریای خزر واقع در شهرستان لنگرود، در طی دوره از خرداد تا تیر سال ۱۳۹۴، طی ۳ دوره جمع‌آوری شدند. در روزهای نمونه‌برداری، دامنه دمای آب دریا حدود ۲۵-۷ درجه سانتی‌گراد بود و میزان شوری آب برابر با ۱ ppt ۱۳-۱۲ بود. نمونه‌های صدف *Cerastoderma* و *Didacna* از بستر دریا توسط نمونه‌گیر Drage تهیه شده و داخل دبه‌های مخصوص قرار داده شد و توسط پمپ هوا، اکسیژن‌رسانی شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. داخل آزمایشگاه به‌وسیله لوپ و کلید شناسایی اطلس بی‌مهرگان دریای خزر از سایر دوکفه‌ای‌ها شناسایی شدند (بیرشتین، ۱۳۷۹). تصاویر دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. همولنف از ماهیچه نزدیک به مرکز (سینوس عضله شکمی)، از طریق شکافی در صدف با استفاده از سرنگ ۱ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. نمونه‌های همولنف در لوله‌های جداگانه (میکروتیوپ‌های ضدانعقاد) قرارداده شدند و برای کاهش توده شدن هموسیت بر روی یخ نگه‌داری شدند. هموسیت از پلاسما با سانتریفیوژ کردن توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل ۵۷۰۲ شرکت Eppendorf در ۸۰۰×g در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه از پلاسما جداسازی شد و هر دو جزء در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا از استفاده مجدد نگه‌داری شدند. پیش از تست آنتی‌میکروبی هموسیت انجمادزدایی شد و به آن سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد (۲۰۰ میکرولیتر به‌ازای ۱۰۶ سلول هموسیت). نمونه‌ها به‌مدت ۶۰ ثانیه در معرض امواج اولتراسوند قرار گرفتند وسپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۴۰۰ g سانتریفوژ شدند مایع رویی دوباره در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد تا بقایای سلولی جدا شوند و مایع‌رویی‌حاصل HLS (Hemocyte Lysate Supernatant) است جمع‌آوری شد. پلاسما یا PL نیز پس از انجماد زدایی به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری شد (Casas، ۲۰۱۱).

شکل ۱: (الف) صدف *Cerastoderma* و (ب) صدف *Didacna*
(بیرشتین، ۱۳۷۹)

میکروارگانیسم منتخب برای مطالعه *Escherichia coli* (ATCC C25922)، *Klebsiella pnuemoniae* (NCTC 5056) و *Enterccus faccium* (ATCC 19433) بوده که به‌صورت لیوفیلیزه از پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری و مجدداً با تست‌های بیوشیمیایی و توسط رنگ‌آمیزی گرم تایید گردید. سویه استاندارد تهیه شده از حالت لیوفیلیزه به‌حالت کشت زنده تبدیل شد. آزمایشات استاندارد جهت تایید خالص‌بودن باکتری‌ها و تست حساسیت به آمپی‌سیلین و جنتامایسین نیز جهت کنترل مثبت باکتری‌ها صورت گرفت. تعیین فعالیت ضدمیکروبی با روش کیفی انتشار دیسک در آگار و دو روش کمی میکرودایلوشن یا ماکرودایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کلنی‌های رشد یافته در بلاد آگار یا نوترینت آگار از برند شرکت مرک (Merck) کشور آلمان، یک کلنی با لوپ استریل به محیط کشت آبگوشت مولر هینتون براث اضافه گردید. سپس این سوسپانسیون برای رسیدن به فاز لگاریتمی در انکوباتور شیکردار در دور rpm۱۵۰ به‌مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. سپس باکتری‌های به‌وسیله سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml) جهت انجام مطالعات ضدباکتریایی همولنف تهیه گردید (Madhumathi، ۲۰۱۱). هدف از تهیه نیم‌مک فارلند اندازه‌گیری کدورت می‌باشد. برای تهیه سوسپانسیون باهم‌زدن مداوم ۰/۵ میلی‌لیتر کلرور باریم را به ۹۹/۵ میکرولیتر اسیدسولفوریک اضافه گردید. از هموسیت‌رقت ۲۵ درصد تهیه گردید به این ترتیب که ۲۵۰ میکرولیتر از هموسیت برداشته شد و با استفاده از محیط مولر هینتون براث به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس رقت‌های سریالی شامل ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶ درصد تهیه گردید. برای بررسی اثرات ضدباکتریایی از روش انتشار دیسک در آگار (Agar disk diffusion) استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده در آزمون‌های آنتی‌بیوگرام شامل مولر هینتون آگار بود. در روش انتشار دیسک پس از تلقیح باکتریایی (کشت چمنی سوسپانسیون‌های باکتریایی به‌وسیله سوآپ استریل) روی محیط آگار، دیسک‌های کاغذی با قطر ۶ میلی‌میتر به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از یکدیگر و از لبه پلیت به‌وسیله یک پنس استریل به‌دقت روی سطح آگار قرار داده شد . از رقت‌های به‌دست آمده همولنف (که در بالا توضیح داده شد) ۲۰میکرولیتر از آن به هر دیسک اضافه شد و بعد از خشک شدن در محیط استریل زیر هود در دمای اتاق به‌مدت ۳ ساعت، به آرامی دیسک‌ها با فشار پنس در محیط آگار ثابت شد و درب پلیت‌ها با استفاده از پارافیلم بسته شد.سپس پلیت‌ها به‌مدت ۳۱ دقیقه برای پیش انتشار درون یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از این مرحله پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ساعت قرار گرفتند. پس از این مدت قطر هاله تشکیل شده اطراف دیسک توسط کولیس به‌دقت اندازه‌گیری شد (Abd El Mageid، ۲۰۱۲؛ Abubakar، ۲۰۰۵). در هر آزمایش نمونه شاهد محیط کشت با دیسک آغشته به سرم فیزیولوژی (شاهد منفی) و محیط کشت با دیسک آغشته به آنتی‌بیوتیک (شاهد مثبت) قرار داده شد (Abd El Mageid، ۲۰۱۲؛ Abubakar، ۲۰۰۵). آزمون‌های حساسیت ضدباکتریایی با ۳ مرتبه تکرار انجام شد و به‌منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضدباکتریایی از دیسک‌های تجاری حاوی آنتی بیوتیک محصول شرکت بیومیرکشور فرانسه شامل جنتامایسین و آمپی‌سیلین (شاهد مثبت) استفاده گردید (Abubakar، ۲۰۱۲).

حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) توسط همولنف به‌وسیله روش ماکرودایلوشن سنجیده شد. بدین‌ترتیب که برای هر باکتری به‌طور مجزا از یک‌سری لوله‌های هشت‌تایی استفاده گردید و رقت‌های مورد نظر از همولنف در لوله‌های حاوی محیط مولر هینتون براث تهیه گردید. شش لوله برای رقت‌های مختلف همولنف و یک لوله به‌عنوان شاهد مثبت (محیط کشت براث+آنتی‌بیوتیک)، و یک لوله به‌عنوان شاهد منفی (محیط کشت براث+سرم فیزیولوژی) درنظر گرفته شد سپس به تمامی لوله‌ها به‌جز شاهد منفی ۱ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری نیم مک فارلند اضافه و توسط سمپلر خوب باکتری را در محیط کشت مخلوط کرده و لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت درانکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و آخرین لوله‌ای که هیچ کدورت رشدی در آن دیده نشد (بالاترین رقتی که کدورتی در آن مشاهده نشد) به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) انتخاب شد (Madhumathi، ۲۰۱۱). حداقل غلظت کشندگی باکتری Minimum Bactericidal Concentration (MBC) توسط همولنف نیز سنجیده شد، بدین‌صورت که پس از تعیین MIC، از لوله‌هایی که فاقد کدورت بود مقدار ۱۰ میکرولیتر روی محیط مولر هینتون آگار، کشت داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. درصورت عدم تشکیل کلنی روی پلیت

مولرهینتون آگار، بالاترین رقت از همولنف که فاقد رشد باکتری روی محیط باشد به‌عنوان MBC درنظر گرفته شد (Madhumathi، ۲۰۱۱).

روش تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات پس از گردآوری در نرم‌افزار Excel به‌عنوان بانک اطلاعاتی ذخیره گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار توسط آزمون آنالیز واریانس انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۰ صورت گرفت.

نتایج

نتایج به‌دست آمده از بررسی فعالیت ضدمیکروبی همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* با تعیین قطر هاله مهار رشد و روش MIC، MBC در جداول ۱ ارائه شده است. مشاهده هاله عدم رشد در محیط کشت باکتری‌های *E. coli*، *K. pnuemoniae* و *E. faccium* مؤید اثر ضدباکتریایی عصاره در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* بود. در باکتری *E. coli* بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاته عدم رشد برای دوکفه‌ای *Cerastoderma* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ و ۱/۵۶٪ برای دوکفه‌ای *Didacna* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ و ۳/۱۲۵ درصد بود. همان‌طورکه مشاهده می‌شود با افزایش غلظت همولنف، قطر هاله بازدارندگی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵) به‌طوری بیش‌ترین هاله بازدارندگی برای دوکفه‌ای *Didacna* معادل ۱۸ میلی‌متر و برای دوکفه‌ای *Cerastoderma* معادل ۱۹/۴ میلی‌متر بود. در باکتری *K. pnuemoniae* بیش‌ترین برای دوکفه‌ای *Cerastoderma* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ درصد و برای دوکفه‌ای *Didacna* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ درصد بود. با افزایش غلظت همولنف، قطر هاله بازدارندگی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که بیش‌ترین قطر هاله در دوکفه‌ای *Didacna* معادل ۱۹/۴ میلی‌متر و در دوکفه‌ای *Cerastoderma* معادل ۲۰/۷ میلی‌متر بود. در باکتری *E. faccium* بیش‌ترین برای دوکفه‌ای *Cerastoderma* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ درصد و برای دوکفه‌ای *Didacna* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ درصد بود. با افزایش غلظت همولنف، قطر هاله بازدارندگی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار قطر هاله در دوکفه‌ای *Didacna* معادل ۱۷ میلی‌متر و بیش‌ترین مقدار قطر هاله در دوکفه‌ای *Cerastoderma* معادل ۱۵/۷ میلی‌متر بود.

جدول ۱: فعالیت ضدمیکروبی همولنف دوکفه‌ای *Didacna* و *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های مختلف

باکتری	صدف	رقت (میکرولیتر/میلی‌لیتر) ٪۲۵	٪۱۲/۵	٪۶/۲۵	٪۳/۱۲۵	٪۱/۵۶	آنتی‌بیوتیک تجاری
E. coli	*Didacna*	۱۸^{a}	۱۵/۷ ^{ab}	۲/۴^{c}	۱/۴^{d}	<۱^{d}	۱۵^{ab}
	Cerastoderma	۱۹/۴^{a}	۱۶/۷ ^{ab}	۱/۴^{c}	<۱^{d}	۰	
K. pnuemoniae	*Didacna*	۱۹/۴^{a}	۱۶^{b}	۱۲^{c}	<۱^{d}	۰	۱۴^{bc}
	Cerastoderma	۲۰/۷^{a}	۱۹^{b}	۸/۴^{c}	۲/۴^{d}	۰	
E. faccium	*Didacna*	۱۷^{a}	۱۵/۴^{ab}	۱۲/۷^{c}	۱/۴^{d}	<۱^{d}	۱۶^{ab}
	Cerastoderma	۱۵/۷^{ab}	۱۵/۷^{ab}	۱۱/۷^{c}	۱/۴^{d}	۰	

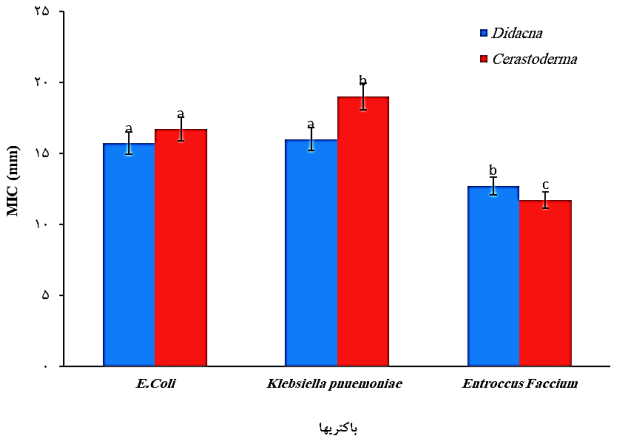
حروف a، b، c و ... نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد.

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی برای رقت‌های مختلف در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در مقابل باکتری‌های *E. coli*، *K. pnuemoniae* و *E. faccium* در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان MIC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* بر علیه باکتری *E. coli* به‌ترتیب ۱۵/۷ و ۱۶/۷ میلی‌متر و میزان MBC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در باکتری *E. coli* به‌ترتیب ۱۵/۷ و ۱۶/۷ میلی‌متر بود. میزان MIC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در باکتری *K. pnuemoniae* به‌ترتیب ۱۶ و ۱۹ میلی‌متر و میزان MBC در همولنف دوکفه‌ای‌های Didacna و Cerastoderma در باکتری *K. pnuemoniae* به‌ترتیب ۱۶ و ۸/۴ میلی‌متر بود. میزان MIC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در باکتری *E. faccium* به‌ترتیب ۱۲/۷ و ۱۱/۷ میلی‌متر و میزان MBC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در باکتری *E. faccium* به‌ترتیب ۱۵/۴ و ۱۱/۷ میلی‌متر بود. درجدول ۲ میزان MIC باکتری‌های *E. coli*، *K. pnuemoniae* و *E. faccium* برای دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* نشان داده شده‌است. بیش‌ترین میزان MIC برای باکتری *K. pnuemoniae* و کم‌ترین میزان در باکتری *E. faccium* مشاهده شد. همولنف صدف *Didacna* دارای MIC پایین‌تری در مقایسه با همولنف صدف *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های *E. coli* (p>۰/۰۵) و *K. pnuemoniae* (p>۰/۰۵) بود اما میزان MIC همولنف صدف *Cerastoderma* در مقایسه با همولنف صدف *Didacna* بر علیه باکتری *Entroccus Faccium* کم‌تر (p<۰/۰۵) بود. درشکل ۳ میزان MBC با باکتری‌های *E. coli*، *K. pnuemoniae* و *E. faccium* در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* نشان داده شده است. همولنف صدف *Didacna* دارای MIC پایین‌تری در مقایسه با صدف *Cerastoderma*

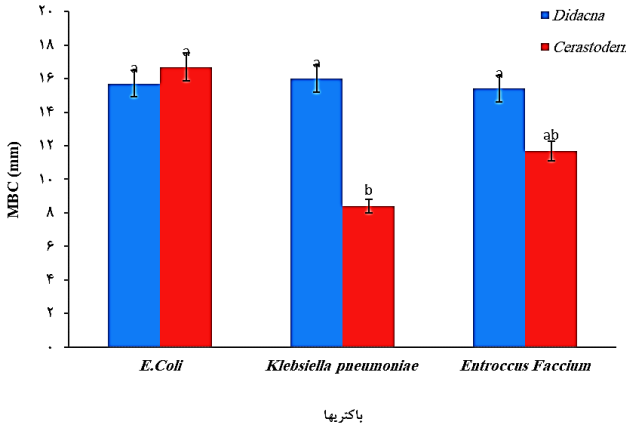
بر علیه باکترهای *E. coli* (p>۰/۰۵) بود اما صدف *Cerastoderma* در مقایسه با صدف *Didacna* میزان MBCبالاتری بر علیه *K.pnuemoniae* (p<۰/۰۵) و *Entroccus Faccium* (p>۰/۰۵) بود.

جدول ۲: میزان MIC و MBC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* برعلیه باکتری های مورد مطالعه

باکتری	صدف	MIC (میلی‌متر)	MBC (میلی‌متر)
E. coli	*Didacna*	۱۵/۷	۱۵/۷
	Cerastoderma	۱۶/۷	۱۶/۷
K. pnuemoniae	*Didacna*	۱۶	۱۶
	Cerastoderma	۱۹	۸/۴
E. faccium	*Didacna*	۱۲/۷	۱۵/۴
	Cerastoderma	۱۱/۷	۱۱/۷



شکل ۲: نمودار MIC باکتری‌های مورد مطالعه در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma*



شکل ۳: نمودار MBC باکتری‌های مورد مطالعه در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma*

بحث

نظر به اهمیت مطالعه برای یافتن ترکیبات ضد که دارای عوارض جانبی متعدد و هم‌چنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌ها می‌شوند، در تحقیق حاضر خصوصیات ضدباکتریایی همولنف دوکفه‌ای‌های *Cerastoderma* و *Didacna* سواحل جنوبی دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر، نشان‌دهنده فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه همولنف دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه بر علیه باکتری‌ها بود. در این پژوهش برای انتخاب درصد مناسب غلظت، از رقت‌های مختلف ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶ درصد استفاده شده است. با افزایش غلظت همولنف، فعالیت ضدباکتریایی همولنف دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد. همولنف صدف *Didacna* دارای MIC پایین‌تری (p>۰/۰۵) در مقایسه با صدف *Cerastoderma* بر علیه باکترهای *E. coli* و *K. pnuemoniae* بود اما میزان MIC همولنف صدف *Cerastoderma* در مقایسه با صدف *Didacna* بر علیه باکتری *Entroccus Faccium* کم‌تر (p<۰/۰۵) بود. هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، مطالعات انجام شده نیز اثرات ضدباکتریایی ترکیبات زیست‌فعال نرم‌تنان و سایر آبزیان را گزارش کرده‌اند. برای مثال Defer و همکاران (۲۰۰۹) نیز فعالیت ضدمیکروبی همولنف دوکفه‌ای‌های *Ruditapes philippinarum*، *Ostrea edulis*، *Cerastoderma edule* و دو گونه شکم‌پای *Buccinum undatum* و *Crepidula fornicate* گزارش کردند. این محققان گزارش کردند که دوکفه‌ای *C. edul* دارای وسیع‌ترین فعالیت ضدباکتریایی همولنف و بالاترین فعایت ضدمیکروبی از قسمت‌های مانتل وابشش متعلق به *O. edulis* مشاهده شد (Defer، ۲۰۰۹). Periyasamy و همکاران (۲۰۱۲) نیز فعالیت ضدمیکروبی عصاره بافتی *Babylonia spirata* (گاستروپود) را مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که تمامی عصاره‌های اتانولی، متانولی،استون، کلروفرمی و آب میان بافتی استخراج شده از *B. spirata* همگی دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه همه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه بودند و آن‌ها دریافتند که در ماهیچه‌های شکم‌پایان، علی‌الخصوص *B. spirata*، یک منبع بزرگ و با ارزش زیست پزشکی موجود می‌باشد (Periyasamy، ۲۰۱۲) که این نتایج با نتایج تحقیق پیش رو مطابقت دارد. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کلاً باکتری‌های گرم مثبت به‌دلیل ساختار دیواره سلولی مشابه، به اجزای همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* خوب پاسخ داده‌اند. هم‌چنین Anderson و Beaven (۲۰۰۱) اثر ضدباکتریایی پلاسمای استخراج شده از یک گونه اویستر *Crassostrea virginica* و دو گونه ماسل *Geukensia demissa* و *Mytilus edulis* را بر علیه باکتری *Bacillus megaterium* مورد مطالعه قرار داده و مشاهده کردند که *C. virginica* و *M. edulis* فعالیت ضدباکتریایی قوی در برابر این پاتوژن نشان می‌دهند در حالی که *G. demissa* فعالیت ضدباکتریایی چندانی ندارد. به‌علاوه مشاهده کردند که فعالیت ضدباکتریایی هموسیت *G. demissa* نسبتاً قوی‌تر از فعالیت ضدباکتریایی پلاسمای آن است. ممکن است ترکیبات ضدمیکروبی

در هموسیت ساخته و ذخیره شوند اما تا وقتی سلول آلوده به میکروب نشده است به‌داخل پلاسما آزاد نشوند. هم‌چنین Sandra و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی خود با مطالعه‌اثرات ضدمیکروبی همولنف دوکفه‌ای دریایی در گالیسیا اسپانیا گزارش کردند که فعالیت ضدمیکروبی در باکتری گرم مثبت قوی‌تر از باکتری گرم منفی بود (Sandra، ۲۰۱۱). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر حساسیت بیش‌تر باکتری *E. faccium* درمقایسه با باکتری‌های *coliE.* و *K. pnuemoniae* با نتایج مطالعه فوق هم‌خوانی دارد. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کلاً باکتری‌های گرم مثبت به‌دلیل ساختار دیواره سلولی مشابه، به اجزای همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* خوب پاسخ داده‌اند. فعالیت ضدمیکروبی همولنف ممکن است از طریق تخریب درون سلولی عوامل بیماریزا یا ترشح ترکیبات ضدمیکروب به‌داخل پلاسما باشد. مولکول‌های سیتوتوکسیک فراوانی در پلاسما و هموسیت نرم‌تنان گزارش شده که شامل آنزیم‌های هیدرولاز لیزوزومال (Pipe، ۱۹۹۰)، ترکیبات فعال اکسیژنی (Amy و Anderson، ۲۰۰۱)، گونه‌های فعال نیتروژنی (Arumugan و همکاران، ۲۰۰۰)، پروتئین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروب (Roch، ۱۹۹۶)، لکتین (Jennafer و James، ۲۰۱۸) و آنزیم‌های باکتریولیتیک مثل لیزوزیم (Hardy، ۱۹۷۶) می‌باشد. هم‌چنین دوکفه‌ای‌ها دارای چندین نوع مولکول دفاعی از قبیل آگلوتین‌ها و گلیکوپروتئین‌هایی هستند که فعالیت ضدباکتری دارند. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد بخشی از فعالیت ضدباکتریایی همولنف دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه به‌دلیل پپتیدها،اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب موجود در آن باشد (Sugesh و Mayayu، ۲۰۱۳). اثر بازدارندگی عصاره‌های دوکفه‌ای‌ها بر عدم رشد میکروب‌های بیماریزا بسیار جالب و درخور توجه هستند، به‌ویژه تاثیر این عصاره‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی حائز اهمیت است، زیرا باکتری‌های گرم منفی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. لذا شناسایی موثرترین ترکیبات موجود و سنجش فعالیت آن بر علیه باکتری‌ها و قارچ‌های مختلف می‌تواند نتایج مناسبی را در راستای تجاری‌سازی این ترکیبات فراهم نماید. براساس نتایج به‌دست آمده مشخص شد که اجزای همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* دارای منبع با ارزشی از خواص ضدمیکروبی هستند و می‌توان بر روی نرم‌تنان دریایی دیگری در این زمینه کار کرد و اگر روزی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی ایجاد شد،در آینده نزدیک می‌توان از پتانسیل دارویی این نرم‌تنان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجو بوده به شماره ۲۰۲۳۰۶۰۳۹۳۱۰۰۲ و بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد لاهیجان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. **بیرشتین، ی.، ۱۳۷۹.** اطلس بی‌مهرگان دریای خزر. ترجمه دلیناد، ل. و نظری، ف.، چاپ اول. تهران. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. مدیریت اطلاعات علمی و روابط بین‌الملل. ۶۱۱ صفحه.

۲. **Abubakar, L.; Mwangi, C.; Uku, J. and Ndirangu, S., 2012**. Antimicrobial activity of various extract of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics. Vol. 1, No. 1, pp: 19-23.

۳. **Amy, E.B. and Anderson, R.S., 2001.** Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. Aquatic Living Resources. Vol. 14, No. 6, pp: 343-349.

۴. **Arumugan, M.; Romestand, B. and Torreilles, J., 2000.** Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate Acetat.Aquatici living resource. Vol. 13, pp: 173-177.

۵. **Canesi, L.; Gallo, G.; Gavioli, M. and Pruzzo, C., 2002.** Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microsc Res Tech. Vol. 57, pp: 469-476.

۶. **Casas, S.; Comesana, P. and Villalba, A., 2011.** Comparison of untibactericla activitiy in the hemolymph of marine bivalves from Galicia (NW Spain). journal of invertebrate pathology. Vol. 106, pp: 343-345.

۷. **Jennafer, C.M. and James, E.B., 2018.** Responses of an oyster host *(Crassostrea virginica)* and its protozoan parasite (*Perkinsus marinus*) to increasing air temperature. Peer J. Vol. 6, pp: e5046.

۸. **Defer, D.; Bourgougnon, N. and Fleury, Y., 2009.** Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. Aquaculture. Vol. 293, pp: 1-7.

۹. **Falanga, A.; Lombardi, L.; Franci, G.; Vitiello, M.; Iovene, M.R.; Morelli, G.; Galdiero, M. and Galdiero, S., 2016.** Marine antimicrobial peptides: nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. International journal of molecular sciences. Vol. 17, No. 5, pp: 785.

۱۰. **Hardy, S.W.; Fletcher, T.C. and Gerrie, L.M., 1976.** Factors in hemolymph of the mussel, *Mytilus edulis*., of possible significance as defense mechanisms. Biochem Soc Trans. Vol. 4, pp: 473-475.

۱۱. **Madhumathi, V.; Deepa, P.; Jeyachandran, S.; Manoharan, C. and Vijayakumar, C., 2011.** Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake. International Journal of Microbiological Research. Vol. 2, No. 3, pp: 213-216.

۱۲. **Malve, H., 2016.** Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. Journal of Pharmacy and Bioallied Science. Vol. 8, No. 2, pp: 83-91.

۱۳. **Manivannan, S.; Balamurugan, M.; Parthasarathi, K.; Gunasekaran, G. and Ranganathan, L.S., 2009.** Effect ofvermicompost on soil fertility and crop productivity-beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Environ. Biol. Vol. 30, pp: 275-281.

۱۴. **Marshall, S.H. and Arenas, G., 2003.** Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. Electro. J. Biotech. Vol. 6, pp: 1-14.

۱۵. **CLSI. 2013.** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard, Eleventh edition. Vol. 3, No. 1.

۱۶. **Pipe, R.K., 1990.** Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem J. Vol. 22, pp: 595-603.

۱۷. **Roch, Ph.; Yang, Y.; Toubiana, M. and Aumelas, A., 2008.** NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activites of derived synthetic Peptides.Developmental and Comparative Immunology. Vol. 32, pp: 227-238.

۱۸. **Sperstad, S.V.; Haug, T.; Blencke, H.M.; Styrvold, O.B.; Li, C. and Stensvåg, K., 2011.** Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. Biotechnology advances. Vol. 29, No. 5, pp: 519-530.

۱۹. **Sugesh, S. and Mayavu, P., 2013.** Antimicrobial activities of two edible bivalves *M. meretrix* and *M. casta*. Pakistan journal of Biological Sciences. Vol. 16, No. 1, pp: 38-43.

۲۰. **Tincu, J.A. and Taylor, S.W., 2004.** Antimicrobial peptides from marine invertebrates. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 48, No. 10, pp: 3645-3654.