

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

- محدثه صلواتی خوشقلب: 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 *Didacna* و *Cerastoderma* سواحل جنوبی دریای خزر بود. برای تعیین فعالیت ضد میکروبی اولیه از روش انتشار دیسک در آگار، ماکرودایلوژن و میکرودایلوژن و برای انتخاب درصد غلظت عصاره‌ها، از رقت‌های مختلف ۰/۲۵٪، 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 ۰/۲۵٪ و ۱/۵۶ و در دوکفه‌ای *Didacna* مربوط به غلظت‌های ۰/۲۵٪ و ۳/۱۲۵ بود. همچنین در باکتری *Klebsiella pneumoniae* (NCTC5056) بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در همولنف دوکفه‌ای *Cerastoderma* به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۰/۲۵٪ و ۳/۱۲۵ و در دوکفه‌ای *Didacna* مربوط به غلظت‌های ۰/۲۵٪ و ۳/۱۲۵ بود. در باکتری *Enterococcus faecium* بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد در دوکفه‌ای *Cerastoderma* مربوط به غلظت‌های ۰/۲۵٪ و ۳/۱۲۵ و در دوکفه‌ای *Didacna* مربوط به غلظت‌های ۰/۲۵٪ و ۱/۵۶ بود. با افزایش غلظت همولنف، فعالیت ضدباکتری آن به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($p < 0/05$). همولنف صدف *Didacna* دارای MIC پایین‌تری در مقایسه با صدف *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* بود اما میزان MIC همولنف صدف *Cerastoderma* در مقایسه با صدف *Didacna* بر علیه باکتری *Enterococcus faecium* کم‌تر بود ($p < 0/05$). بنابراین با توجه به یافته‌های این پژوهش *Didacna* و *Cerastoderma* می‌تواند به‌عنوان منبعی با ترکیباتی با ارزش و دارای توان زیست‌فعالی در تهیه داروهای ضد میکروبی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ماکرودایلوژن، میکرودایلوژن، ضدباکتری، همولنف، *Didacna*، *Cerastoderma*



مقدمه

کفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* سواحل جنوبی دریای خزر بود. مطالعه خصوصیات ضدباکتریایی این ترکیبات و همچنین شناسایی و جداسازی آن‌ها زمینه تحقیقات وسیعی را در زمینه معرفی ترکیبات ضد میکروب طبیعی جدید برای کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی، دارویی و آبی‌پروری فراهم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری دوکفه‌ای و تهیه همولف: 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 ۱۳-۱۲ ppt بود. نمونه‌های صدف *Didacna* و *Cerastoderma* 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 به وسیله 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. همولف از ماهیچه نزدیک به مرکز (سینوس عضله شکمی)، از طریق شکافی در صدف با استفاده از سرنگ ۱ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. نمونه‌های همولف در لوله‌های جداگانه (میکروتیوپ‌های ضدانعقاد) قرار داده 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 ۸۰۰x در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 به مدت ۶۰ ثانیه در معرض امواج اولتراسوند قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۴۰۰ g سانتریفیوژ شدند مایع رویی دوباره در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد تا بقایای سلولی جدا شوند و مایع رویی حاصل (HLS (Hemocyte Lysate Supernatant) است جمع‌آوری شد. پلاسما یا PL نیز پس از انجماد زدایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری شد (Casas, ۲۰۱۱).

در سالیان اخیر مطالعات فراوانی به منظور شناسایی و معرفی ترکیبات ضد میکروبی 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 به فردی دارند که علت بروز این ویژگی‌های منحصر به فرد، 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 ضد میکروبی قلمرو خود را حفظ می‌کنند (Falanga, ۲۰۱۶; Sperstad, ۲۰۱۱; Taylor و Tincu, 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 همورال (لک‌تین، آگلوتینین، آنزیم‌های لیزوزومال و فاکتورهای ضد میکروبی) وابسته هستند (Canesi, ۲۰۰۲). بنابراین نرم‌تنان دریایی مانند صدف‌های دوکفه‌ای، منبع با ارزشی از ترکیبات ضد میکروب 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 ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد باکتریایی بسیار خوبی برخوردارند (Manivannan, ۲۰۱۱). با توجه به این که زندگی در دریا سابقه بیش‌تری نسبت به زندگی در خشکی دارد آزمون فرصت بیش‌تری برای تکامل در خود برای مواجهه با شرایط گوناگون داشته‌اند، از این رو به نظر می‌رسد این موجودات به‌ویژه گونه‌های کم‌تحرك‌تر می‌توانند حاوی ترکیبات مفیدمانند انواع پپتیدهای ضد میکروبی باشند (Malve, ۲۰۱۶). تاکنون در رابطه با خصوصیات ضد میکروبی 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 آبیچر ایفا می‌نمایند. با توجه به حجم انبوه مطالعات بر روی نرم‌تنان خلیج فارس و در مقابل مطالعات اندک بر روی نرم‌تنان سواحل شمالی، هدف از مطالعه حاضر، بررسی خصوصیات ضد باکتریایی همولف دو



باکتریایی (کشت چمنی سوسپانسیون‌های باکتریایی به‌وسیله سوآپ استریل) روی محیط آگار، دیسک‌های کاغذی با قطر ۶ میلی‌متر 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) ۲۰ میکرولیتر از آن به هر دیسک اضافه شد و بعد از خشک شدن در محیط استریل زیر هود در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت، به آرامی دیسک‌ها با فشار پنس در محیط آگار ثابت شد و درب پلیت‌ها با استفاده از پارافیلیم بسته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۳۱ دقیقه برای پیش انتشار درون یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از این مرحله پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت 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 آنتی‌بیوتیک 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 ماکرودایلوژن سنجیده شد. بدین ترتیب که برای هر باکتری به‌طور مجزا از یک سری لوله‌های هشت‌تایی استفاده گردید و رقت‌های مورد نظر از همولنف در لوله‌های حاوی محیط مولر هینتون برات تهیه گردید. شش لوله برای رقت‌های مختلف همولنف و یک لوله به‌عنوان شاهد مثبت (محیط کشت برات + آنتی‌بیوتیک)، و یک لوله به‌عنوان شاهد منفی (محیط کشت برات + سرم فیزیولوژی) در نظر 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 به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و آخرین لوله‌ای که هیچ‌کدورت 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 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در صورت عدم تشکیل کلنی روی پلیت



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

میکروارگانیزم منتخب برای مطالعه *Escherichia coli* (ATC 25922)، *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 5056) و *Enterococcus faecium* (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. سوبه استاندارد تهیه شده از حالت لیوفیلیزه به‌حالت کشت زنده تبدیل شد. آزمایشات استاندارد جهت تایید خالص بودن باکتری‌ها و تست حساسیت به آمپی‌سیلین و جنتامایسین نیز جهت کنترل مثبت باکتری‌ها صورت گرفت. تعیین فعالیت ضد میکروبی با روش کیفی انتشار دیسک در آگار و دو روش کمی میکرودایلوژن یا ماکرودایلوژن 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 آنگوشت مولر هینتون برات اضافه گردید. سپس این سوسپانسیون برای رسیدن به فاز لگاریتمی در انکوباتور شیکردار در دور ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. سپس باکتری‌های به‌وسیله سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) جهت انجام مطالعات ضدباکتریایی همولنف تهیه گردید (Madhumathi، ۲۰۱۱). هدف از تهیه نیم مک فارلند اندازه‌گیری کدورت می‌باشد. برای تهیه سوسپانسیون با هم‌زدن مداوم ۰/۵ میلی‌لیتر کلرور باریم را به ۹۹/۵ میکرولیتر اسیدسولفوریک اضافه گردید. از هموسیت رقت ۲۵ درصد تهیه گردید به این ترتیب که ۲۵۰ میکرولیتر از هموسیت برداشته شد و با استفاده از محیط مولر هینتون برات 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

۲۵ و ۳/۱۲۵ درصد بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت همولنف، قطر هاله بازدارندگی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$) به‌طوری‌بیش‌ترین هاله بازدارندگی برای دوکفه‌ای *Didacna* معادل ۱۸ میلی‌متر و برای دوکفه‌ای *Cerastoderma* معادل ۱۹/۴ میلی‌متر بود. در باکتری *K. pneumoniae* 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 ($p < 0/05$)، به‌طوری‌که بیش‌ترین قطر هاله در دوکفه‌ای *Didacna* معادل ۱۹/۴ میلی‌متر و در دوکفه‌ای *Cerastoderma* معادل ۲۰/۷ میلی‌متر بود. در باکتری *E. faecium* 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 ($p < 0/05$)، به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار قطر هاله در دوکفه‌ای *Didacna* معادل ۱۷ میلی‌متر و بیش‌ترین مقدار قطر هاله در دوکفه‌ای *Cerastoderma* معادل ۱۵/۷ میلی‌متر بود.

مولر هینتون آگار، بالاترین رقت از همولنف که فاقد رشد باکتری روی محیط باشد به‌عنوان MBC در نظر 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 ضد میکروبی 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. pneumoniae* و *E. faecium* مؤید اثر ضدباکتریایی عصاره در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* بود. در باکتری *E. coli* بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد برای دوکفه‌ای *Cerastoderma* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵ و ۱/۵۶٪ برای دوکفه‌ای *Didacna* به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های

جدول ۱: فعالیت ضد میکروبی همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های مختلف

آن‌تی‌بیوتیک تجاری	رقت (میکرولیتر/میلی‌لیتر)					صدف	باکتری
	۱/۵۶٪	۳/۱۲۵٪	۶/۲۵٪	۱۲/۵٪	۲۵٪		
۱۵ ^{ab}	<۱ ^d	۱/۴ ^d	۲/۴ ^c	۱۵/۷ ^{ab}	۱۸ ^a	<i>Didacna</i>	<i>E. coli</i>
	.	<۱ ^d	۱/۴ ^c	۱۶/۷ ^{ab}	۱۹/۴ ^a	<i>Cerastoderma</i>	
۱۴ ^{bc}	.	<۱ ^d	۱۳ ^c	۱۶ ^b	۱۹/۴ ^a	<i>Didacna</i>	<i>K. pneumoniae</i>
	.	۲/۴ ^d	۸/۴ ^c	۱۹ ^b	۲۰/۷ ^a	<i>Cerastoderma</i>	
۱۶ ^{ab}	<۱ ^d	۱/۴ ^d	۱۲/۷ ^c	۱۵/۴ ^{ab}	۱۷ ^a	<i>Didacna</i>	<i>E. faecium</i>
	.	۱/۴ ^d	۱۱/۷ ^c	۱۵/۷ ^{ab}	۱۵/۷ ^{ab}	<i>Cerastoderma</i>	

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

Didacna و *Cerastoderma* در باکتری *E. faecium* به‌ترتیب ۱۵/۴ و ۱۱/۷ میلی‌متر بود. در جدول ۲ میزان MIC باکتری‌های *E. coli*، *K. pneumoniae* و *E. faecium* برای دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان MIC برای باکتری *K. pneumoniae* و کم‌ترین میزان در باکتری *E. faecium* مشاهده شد. همولنف صدف *Didacna* دارای MIC پایین‌تری در مقایسه با همولنف صدف *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های *E. coli* ($p > 0/05$) و *K. pneumoniae* ($p > 0/05$) بود اما میزان MIC همولنف صدف *Cerastoderma* در مقایسه با همولنف صدف *Didacna* بر علیه باکتری *Enterococcus faecium* کم‌تر ($p < 0/05$) بود. در شکل ۳ میزان MBC با باکتری‌های *E. coli*، *K. pneumoniae* و *E. faecium* در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* نشان داده شده است. همولنف صدف *Didacna* دارای MIC پایین‌تری در مقایسه با صدف *Cerastoderma*

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی برای رقت‌های مختلف در دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در مقابل باکتری‌های *E. coli*، *K. pneumoniae* و *E. faecium* 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. pneumoniae* به‌ترتیب ۱۶ و ۱۹ میلی‌متر و میزان MBC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در باکتری *K. pneumoniae* به‌ترتیب ۱۶ و ۸/۴ میلی‌متر بود. میزان MIC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* در باکتری *E. faecium* به‌ترتیب ۱۲/۷ و ۱۱/۷ میلی‌متر و میزان MBC در همولنف دوکفه‌ای‌های

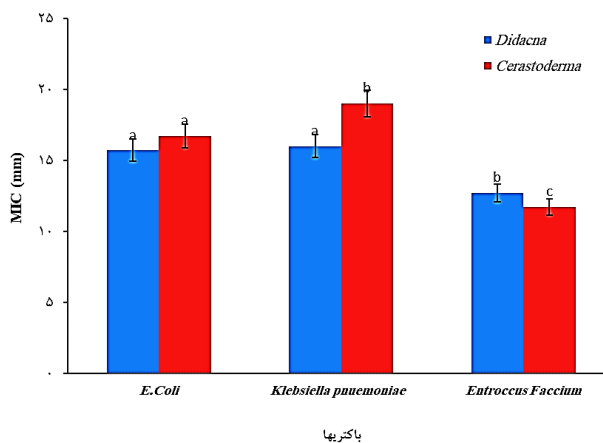


می شوند، در تحقیق حاضر خصوصیات ضدباکتریایی همولنف دوکفه‌ای‌های *Cerastoderma* و *Didacna* سواحل جنوبی دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر، نشان‌دهنده فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه همولنف دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه بر علیه باکتری‌ها بود. در این پژوهش برای انتخاب درصد مناسب غلظت، از رقت‌های مختلف ۰.۲۵، 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 ($p > 0.05$) در مقایسه با صدف *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* بود اما میزان MIC باکتری *Enterococcus Faccium* کم‌تر ($p < 0.05$) بود. هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، مطالعات انجام شده نیز اثرات ضدباکتریایی ترکیبات زیست‌فعال نرم‌تنان و سایر آبزبان را گزارش کرده‌اند. برای مثال *Defer* و همکاران (۲۰۰۹) نیز فعالیت ضد میکروبی همولنف دوکفه‌ای‌های *Cerastoderma edule*، *Ostrea edulis*، *Ruditapes philippinarum* 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 فعالیت ضد میکروبی از قسمت‌های مانتل و ابشش متعلق به *O. edulis* مشاهده شد (*Defer*، ۲۰۰۹). *Periyasamy* و همکاران (۲۰۱۲) نیز فعالیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 به دلیل 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 ضد میکروبی

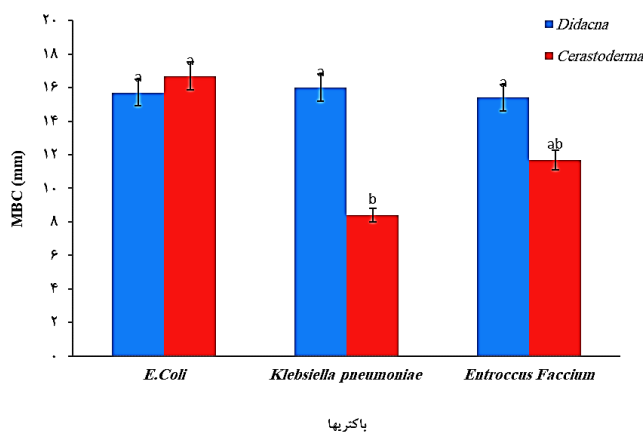
بر علیه باکتری‌های *E. coli* ($p > 0.05$) بود اما صدف *Cerastoderma* در مقایسه با صدف *Didacna* میزان MBC بالاتری بر علیه *K. pneumoniae* ($p < 0.05$) و *Enterococcus Faccium* ($p > 0.05$) بود.

جدول ۲: میزان MIC و MBC در همولنف دوکفه‌ای‌های *Didacna* و *Cerastoderma* بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری	صدف	MIC (میلی‌متر)	MBC (میلی‌متر)
<i>E. coli</i>	<i>Didacna</i>	۱۵/۷	۱۵/۷
	<i>Cerastoderma</i>	۱۶/۷	۱۶/۷
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Didacna</i>	۱۶	۸/۴
	<i>Cerastoderma</i>	۱۹	۱۵/۴
<i>E. faccium</i>	<i>Didacna</i>	۱۱/۷	۱۱/۷
	<i>Cerastoderma</i>	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



منابع

۱. بیرشتین، ی.، ۱۳۷۹. اطلس بی‌مهرگان دریای خزر. ترجمه دلبند، 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 Torrelles, J., 2000.** Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate Acetat. Aquatic 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 antibacterial activity 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. **Falano, 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.; Jevachandran, 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 of vermicompost 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 activities 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. **Suges, S. and Mayayu, 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, I.A. and Tavior, S.W., 2004.** Antimicrobial peptides from marine invertebrates. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 48, No. 10, pp: 3645-3654.

تشکر و قدردانی

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

