مطالعه ساختار بیوشیمیایی وخواص آنتی باکتریایی همولنف جنس نر و ماده میگو ی آب شیرین (Macrobrachium nipponense)

کتایون کریم‌زاده*[۱]، عسگر زحمتکش[۲]، معصومه پرمهر[۱]

چکیده

هدف از مطالعه حاضر شناسایی ساختار بیوشیمیایی همولنف میگوی آب شیرین (Microbrachium nipponense) و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن در دوزهای مختلف بر روی چند سویه پاتوژن می‌باشد. بدین منظور ۸۰ عدد میگوی آب شیرین با میانگین طولی ۱/۸±۰/۱۲ سانتی‌متراز تالاب انزلی جمع‌آوری گردید.پس از جداسازی جنس‌های نر و ماده از یکدیگر، نمونه گیری از طریق سینوس شکمی صورت گرفته وساختار همولنف جمع آوری شده با روش الکتروفورز وآنالیز FTIR تعیین گردید. فعالیت ضد باکتریایی پروتئین همولنف وهمولنف میگوها بر علیه ۵ سویه باکتریایی پاتوژن(ویبریوکلره، اشریشیا کلای، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، کلبسیلاپنومونه) در دوزهای ۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر به روش انتشار از دیسک مورد مطالعه قرار گرفت. در الگوی الکتروفورتیک همولنف میگوهای نر و ماده حضور پروتئینهایی با وزن مولکولی بین KD 100-22 مشاهده گردید. ساختار همولنف براساس آنالیز FTIR شامل ساختارهای منظم ونامنظم دوم پروتئینها است. تفاوت معنی‌داری بین پروتئین‌های همولنف در جنس نر و ماده در قدرت باکتری کشی آنها نسبت به سویه‌های مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵). غلظت‌های مختلف از همولنف، فعالیت‌های مهاری متفاوتی را در سویه‌های باکتریایی نشان دادند. همچنین در میزان فعالیت ضد باکتریایی، اختلاف معنی‌داری بین همولنف جنس نر و جنس ماده مشاهده گردید (P>۰/۰۵). بیشترین اثر مهاری در همولنف جنس نر برعلیه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و ویبریو کلره مشاهده شد. در صورتی‌که کمترین میزان فعالیت ضد باکتریایی را همولنف در جنس ماده بر علیه سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس و اشریشیا کلای با قطر عدم هاله رشد ۰/۱۲ ± ۵/۹ و ۰/۰۸±۵/۶ میلی‌متر نشان داد. نتایج این تحقیق نشان دادند که همولنف میگوی آب شیرین از فعالیت ضد باکتریایی مناسبی برخوردار است و می‌تواند جایگزینی برای داروهای شیمیای با خواص آنتی بیوتیکی باشد.

واژگان کلیدی: *فعالیت ضدباکتریایی، همولنف، الکتروفورز، میگو، انتشار از دیسک*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۲۴

مقدمه

مکانیسم دفاعی در سخت‌پوستان شامل مقاومت ذاتی (طبیعی) و یا مقاومت (ایمنی) اکتسابی است. که شامل پاسخ‌های ایمنی سلولار و هومورال می‌باشد. این پاسخ‌ها با تولید عوامل انعقاد کننده خون، ملانیزه شدن و پپتیدهای ضد میکروبی و فاگوسیتوز کننده میکروارگانیسم‌های پانوژن در هموسیت‌ها همراه است(۱۳). همولنف در سخت‌پوستان شامل سلول‌های دفاعی هموسیت است که در میگوی آب شیرین مانند سایر سخت پوستان در پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان نقش مهمی به عهده دارد (۱۳و۱۰).

در سال‌های اخیر مشخص شده است که بسیاری از موجودات از پپتیدهای ضدمیکروبی (Antimicrobial peptides; AMPs) که بخشی از سیستم دفاعی آنها می‌باشند جهت دفاع در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌کنند (۲۶ و ۳).

پپتیدهای ضدمیکروبی AMPs از اجزای اصلی سیستم دفاعی ذاتی بسیاری از موجودات سخت‌پوستان می‌باشند که نقش مهمی در حفاظت میزبان از هجوم میکروب‌ها به عهده دارند (۲۶). پپتیدهای ضدمیکروبی براساس طول و ساختارهای دوم و سوم پروتئین‌ها، حضور و عدم حضور پیوندهای سولفیدی به گروه‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شود (۲۶و۱۹). وجود اطلاعات در خصوص اهمیت بالینی این پپتیدها منجر به بررسی آنها در میگوی آب شیرین شده است حضور ترکیبات زیست فعال بسیاری در همولنف سخت‌پوستان گزارش شده است که دارای خواص بیولوژیک هستند(۲۵). در مطالعاتی که روی همولنف سخت‌پوستان بویژه خرچنگ‌ها و میگوها صورت گرفته شده است، خواص دارویی مانند خواص ضدسرطانی (۲۲) وآنتی اکسیدانی آن گزارش شده است(۱۲).

*۱- گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان ، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران (karimzadehkathy@yahoo.co.uk)

۲- بخش شیلات، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین فعالیت باکتری کشی هموسیت‌ها در برخی از سخت‌پوستان گزارش شده است(۲۹و۲۲،۱۷). در خرچنگ ساحلی (Carsinus maenas) پروتئین‌های جدا شده با وزن مولکولی حدود ٦/٥ کیلو دالتون از همولنف با خاصیت ضدباکتریایی جدا شده است است (۱۸). همچنین فعالیت ضدباکتری همولنف در بسیاری از سخت‌پوستان مانند خرچنگ آبی ((Callinetes sapidus (8) خرچنگ شنی (Scylla Serrata) (14) و نیز در جنس Ocypodema crocora (27) و Carcinus maenas مشخص شده است (۱۸) با وجود مطالعاتی که در سراسر جهان در خصوص خواص ضد میکروبی همولنف سخت پوستان انجام شده است، اطلاعات اندکی درارتباط با فعالیت زیستی همولنف میگوی آب شیرین به ویژه در جنس‌های نر و ماده موجود می‌باشد. از جمله تحقیقاتی که بر روی همولنف میگوی آب شیرین انجام شده است می‌توان به مطالعه وانگ و همکاران (۲۸) اشاره کرد که ترادف ژنی ۵ فاکتور لیپوپلی ساکاریدی با خاصیت ضد باکتریایی در همولنف میگو آب شیرین تعیین شده است.

در سالهای اخیر با توجه به گسترش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها (پادزیست‌ها)، ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنتی بیوتک افزایش یافته است، لذا یافتن ضد میکروبی از منابع طبیعی خشکی و دریایی ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به اینکه میگوی آب شیرین (M. nipponense) در بسیاری از رودخانه ها وتالاب‌های شمال شرق وغرب کشور حضورداشته و از جمعیت مناسبی نیز درتالاب انزلی، در سواحل جنوبی دریای خزر برخوردار است(٦)، بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی ساختار همولنف میگوی آب شیرین و نیز شناسایی اثر ضد باکتریایی همولنف در جنس‌های نر و ماده این میگو بر روی سویه‌های پاتوژن انسانی انجام گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه ۸۰ قطعه میگوی آب شیرین (Maerobrachium nipponense) ظاهرا سالم با طول تقریبی ۱۲/۰±۱/۸cm در فصل بهار (اردیبهشت) از تالاب انزلی به کمک تله تاشو صید گردید و به آزمایشگاه شیلات مرکز آموزش شیلات میرزاکوچک خان در رشت منتقل و در داخل تانک با هوادهی کامل نگهداری گردید.

جمع‌آوری همولنف

نمونه گیری توسط سرنگ انسولین با سر سوزن شماره ٢٦ از سینوس شکمی صورت گرفت (٤). نمونه‌های همولنف هر ۱۰ قطعه میگو به تفکیک جنسیت در میکروتیوب که حاوی بافر سیترات سدیم (جهت جلوگیری از انعقاد) با PH برابر ٤/٦ می‌باشد منتقل شدند. سانتزیفیوز با دور 10 rpm هزار به مدت ۱۰دقیقه در دمای ٤˚C انجام گرفت. مایع‌رویی جمع‌آوری شده و جهت آنالیزهای بعدی در درجه حرارت ٤˚ C قرار گرفت .

تخلیص پروتئین توسط روش ترسیب

پروتئین‌های همولنف توسط آمونیم سولفات ٧٥٪ ترسیب گردیدند و بعد از نگهداری به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤˚C، در دور 15000 rpm به مدت ٢٠´ در دمای ٤˚C سانتریفیوژ گردیده و رسوب حاصله در این مرحله توسط بافر استات 50 mM)با ٥ (PH = به شکل سوسپانسیون ایجاد گردید (٨).

تهیه باکتری

کشت‌های خالص از باکتری‌های Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Bacillus subtilis (ATCC 465), Escherichia coli (ATCC 25922), Klebsiella pneumoniae, (ATCC 10031) and Vibrio cholerae (ATCC14035) از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه و تا زمان مطالعه در دمای ملی یخچال نگهداری شد. روز قبل از انجام آزمایش، از کشت مادر، مقداری به محیط مولر هینتون برات (muller- hinton- Broth) افزوده گردید و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧˚C در انکوباتور نگهداری شدند باکتری‌ها با غلظت ٠/٥ مک فارلند (٨١٠×٥/١). توسط سواب کتان استریل به صورت چمنی در پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شدند و پس از قرار دادن دیسک‌های استریل توسط پنس استریل شده بر روی پلیت‌ها با فاصله مناسب،٢٠µm از همولنف بر روی

www.SID.ir

دیسک‌ها ریخته شد دیسک‌های خام استریل بـه قطـر ٦mm از غوطه‌وری در همولنف‌های جنس نر و ماده روی سـطح محـیط کشت حاوی باکتری قرار داده شد. از دیسک‌های آنتـی بیوتیـک جنتامایسین (ساخت شرکت ایران دارو) به عنـوان کنتـرل مثبـت استفاده شد (٤ و ١). پلیت‌ها به صورت وارونـه در دمـای ٣٧°C – ٣٥ به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند ناحیـه مهـار شـد (هالـه عدم رشد) باکتری توسط کولیس ورینـه بـا دقـت انـدازه‌گیـری شدند.

تعیین غلظت پروتئین

میـزان پـروتئین همولنـف توسـط روش Bradford بـه کمـک استاندارد آلبومین گاوی تعیین گردید (٢).

الکتروفورز پلیاکریلآمید

الکتروفورز پلیاکریل آمید همولنف وپـروتیین‌هـای آن بـه روش Laemmli (11) انجام گرفت. پس از تهیه ژل پلـی اکریـل آمیـد ١٢٪، نمونه‌های بر روی ژل برده شدند. الکتروفـورز در حضـور بافر تریس هیدروکلراید ٥٠ mM(حاوی گلیسـین ٢٠٠ mM و SDS ٠/١ % بـا PH برابـر ٨/٦)انجـام گرفـت .پـس از اعمـال ولتاژی معادل V150 و شدت جریان 20 mA آمپـر بـه مـدت ٢ ساعت الکتروفورز به پایان رسـیده وژل حاصـله از الکتروفـورز توسط ماده رنگی کوماسی بلو R ٣٥٠ - رنگ‌آمیزی گردید.

طیـف‌سـنجی تبـدیل فوریـه مـادون قرمـز Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR)

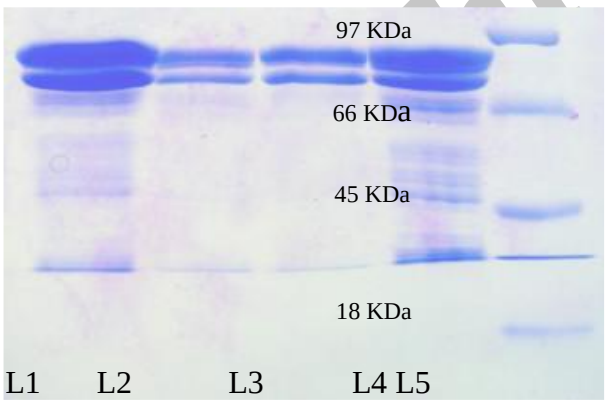
جهـت تعیـین سـاختار و انـدازه‌گیـری ترکیبـات شـیمیائی در همولنف وپروتیین‌ها از طیف سنجی مادون قرمز استفاده گردید. حدود ٥ml از نمونه همولنف بـا ٥٠ mg تـا ١٠٠ برمیـد پتاسـیم خشک مخلوط گردید وپس از فشرده سازی و تهیه دیسک‌هایی با قطر ١٠mm آماده‌سازی گردید. و به آزمایشگاه آنالیز دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تحویل داده شد تـا مـورد آنـالیز قـرار گیرد (٢٧).

تحلیل آماری

تخلیل آماری آزمایش‌ها در ٣ تکرار انجام شد. تجزیـه و تحلیـل داده‌های آماری با اسـتفاده از نـرم‌افـزار SPSS17 انجـام شـد. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای تجزیه و تحلیـل داده‌هـا و جهت مقایسه بـین تیمارهـا از آزمـون تـوکی (دانکـن) اسـتفاده گردید.

نتایج

میزان پروتیئن همولنـف در جنس‌هـای نـر و مـاده میگـوی آب شیرین برابر با ١/٨٢±٠/٣٤و١/٥٨±٠/١٢ میلی گرم بر میلـی‌لیتـر به دسـت آمـد. الگـوی الکتروفورزهمولنـف و پـروتئین هـر دو جـنس میگـو M.nipponens در نگـاره ١ آورده شـده اسـت. پروتئین‌های مختلفی با وزن مولکولی حـدود ١٨ تـا ٩٠ کیلـو دالتون براساس مارکر استاندارد قابل تشخیص هسـتند تفـاوت قابل ملاحظه ای بین الگوی الکتروفـورز همولنـف نـر و مـاده (L1 و L4) و پـــروتیین همولنـــف نـــر و مـــاده در الگـــوی الکتروفورز مشاهده نگردید اما میـزان و تـراکم باننـدها بـا وزن مولکولی ٧٠ تا ٩٠ کیلو دالتون در همولنف جـنس نـر قـدری بیشتر از جنس ماده می‌باشد.

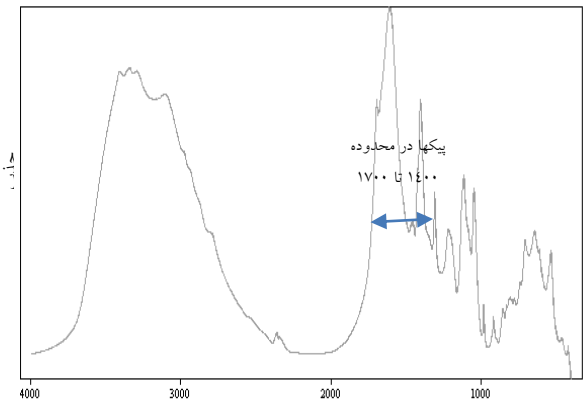


نگاره ١– الگوی الکتروفورزهمولنف و پروتئین‌های جنس نر و ماده میگوی رودخانه ای L1 : ..M.nipponense همولنف جنس نر L2 :پروتئین همولنف جنس نرL3 : پروتیین همولنف جنس ماده : L4 همولنف جنس ماده، : L5 مارکر پروتینی باوزن مولکولی (١٨،٤٥،٦٦،٩٧ کیلو دالتون)

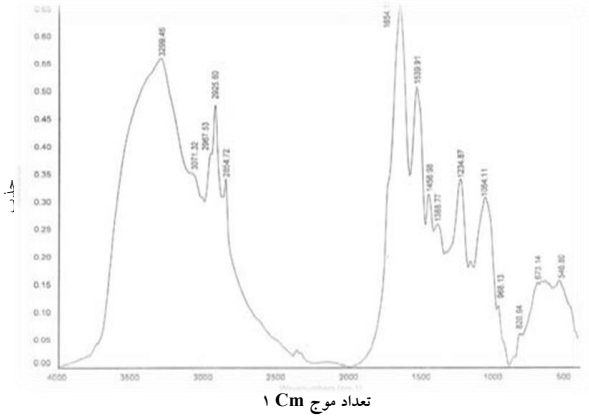
با توجه به نتایج طیـف FTIR حضـور پیـک‌هـا در محـدوده ١٦١٠ تا ١٧٠٠ نانومتر نشان دهنده در همولنف جـنس نـر و

www.SID.ir

جنس ماده، حضور ساختارهای منظم ونامنظم دوم پروتیین‌ها در همولنف می‌باشد (نگاره ۲و ۳). با توجه به گستردگی پیک در محدوده ۱۶۵۹ نانومتر احتمالا بیش از ۳۵٪ این ساختار متعلق به ساختار آلفا هلیکس و پیک‌های محدوده ۱۶۲۳ و ۱۶۹۵ نانومتر (۲۲/۵٪) ساختار کنفورماسیون بتا را نشان می‌دهد. درمحدوده ۱۶٤۰ ساختار نا منظم مارپیچ‌های تصادفی نیز انتظار می‌رود. حضور پیک در محدوده ۳۰۰۰ تا ۳٤٦۰ نانومتر نشان دهنده پیوند کششی H-N مربوط به سولفانامید نوع دوم و کشش نامتقارن C-H ۲ در ساختار پروتیئن می‌باشد. حضور پیک‌ها در محدوده‌های ۱٤۰۰ تا ۱۷۰۰، ۱۳۸۰ تا ۱٤۰۰، ۱۲۰۰ تا ۱۲۵۰، ۹۰۰ تا ۹۵۰ و ۸۱۰ تا ۸۸۰ نانومتر به ترتیب گروه‌های عملکردی C-H در ترکیبات آروماتیک، تری‌آزول، ترکیبات تیوفن، ترکیبات برمو وسولفونیک اسید را نشان می‌دهد. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بین حضور پیک‌ها در همولنف جنس‌های نر و ماده مشاهده نشد.



نگاره ۲- آنالیز FTIR پروتیین همولنف جنس نر میگوی Macrobrachium nipponense در ناحیه ٤۰۰ Cm -1 ٤۰۰۰-



نگاره ۳- آنالیز FTIR پروتیین همولنف میگوی جنس ماده Macrobrachium nipponense در ناحیه Cm -1 ٤۰۰ ٤۰۰۰-

میزان پروتیئن همولنف در میگوی آب شیرین برابر با ۱/۸۲±۰/۳٤ و۱/۵۸±۰/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب در جنس نر و ماده مشاهده گردید.

اثرات ضدباکتری پروتیئن همولنف و همولنف دو جنس نر و ماده میگو M.nipponenes با استفاده از آزمون انتشاراز دیسک تعیین گردید که نتایج این آزمون در ادامه آورده شده است.

پروتیئن‌های همولنف در هر دو جنس دارای هاله عدم رشد بزرگتری در برابر باکتری‌های ویبریوکلره واشریشیا کلی، بودند و فعالیت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به جنتامایسین نشان دادند ($P<۰/۰۵$). کمترین هاله عدم رشد در سویه‌های باسیلوس سابتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردید. اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها در حضور پروتئین همولنف و شاهد بود(جدول ۱). تفاوت معنی‌داری بین پروتیئن‌های همولنف جنس نر و ماده در قدرت باکتری کشی آنها نسبت به سویه‌های مختلف مشاهده نشد.

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد پروتیین همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی و آنتی بیوتیک جنتامایسین برعلیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

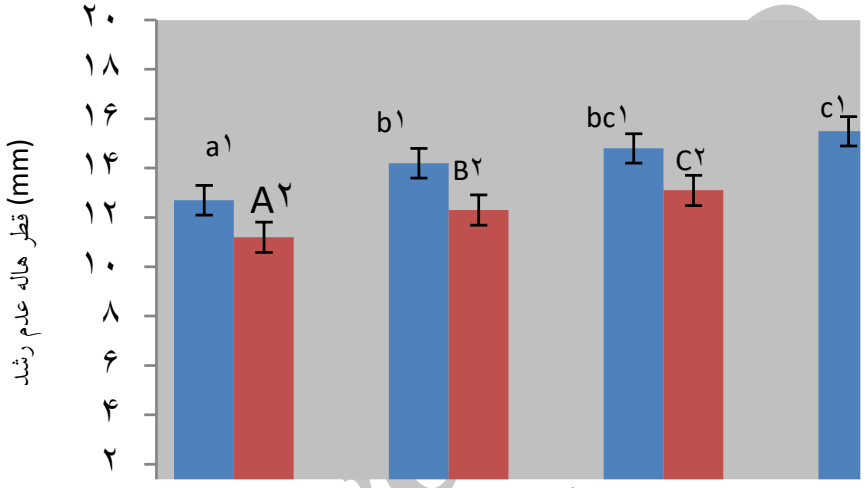
باکتری	پروتیئن همولنف (جنس نر) ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	پروتیئن همولنف (جنس ماده) ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	جنتامایسین(**۱۰µg/disc**)
S. aureus	^{aA}۷/۱۷±۰/۲	^{aA}۷/۲۸±۰/۳٤	^{b}۱۱/۱۵±۰/۲۵
B. subtilis	^{aA}۷/۵٤±۰/۱۲	^{aA}۷/۲۱±۰/۷٦	^{b}۱۹/۱۰±۰/۳
E.coli	^{bB}۱۰/۳٦±۰/۲٦	^{bB}۱۰/۵۱±۰/۱٦	^{a}۸/۳۰±۰/۳٤

Archive of SID
www.SID.ir

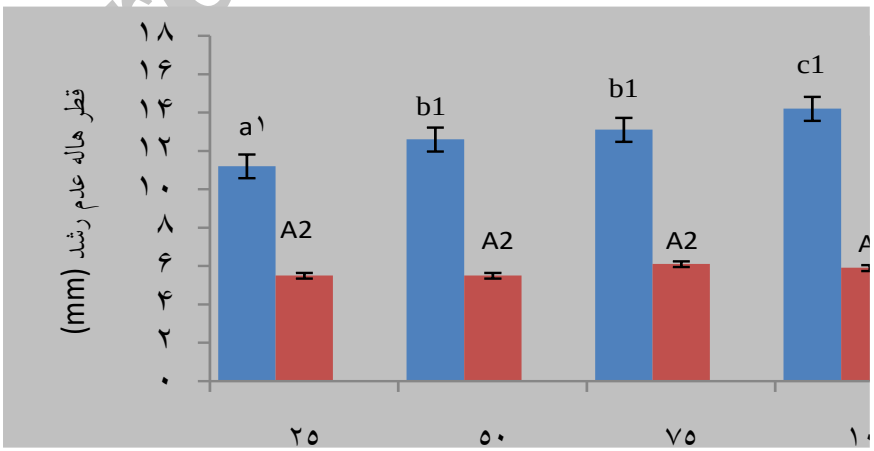
K. pneumoniae	^{aA}۸/۱۸±۰/۱۵	^{aA}۷/۴۳±۰/۳۷	^{b}۱۲/۸۵±۰/۱
V.cholerae	^{aB}۱۱/۶۵±۰/۲	^{aB}۱۱/۳۸±۰/۷۳	^{b}۷/۷۶±۰/۱

(حروف غیر همنام نشا ن دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان۹۵٪ است. حروف کوچک اختلاف در ردیف وحروف بزرگ اختلاف در ستون را نشان می‌دهد.)

بیشترین اثر ضدباکتری در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت 100 میکروگرم از همولنف با قطر هاله عدم رشد ۱۵/۵±۰/۱۷ میلی متر در جنس نر مشاهده گردید. کمترین قطر هاله عدم رشد (۱۱/۲±۰/۰۴) مربوط به غلظت ۲۵ میکروگرم در جنس ماده مشاهده گردید. این غلظت از همولنف با سایر غلظت‌ها و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین داشت (نمودار۱) (P<۰/۰۵).



نمودار۱- اثرضد باکتری همولنف جنس‌های نر و ماده میگو M.niponense بر باکتری Staphylococos auraus. اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار می‌باشد.

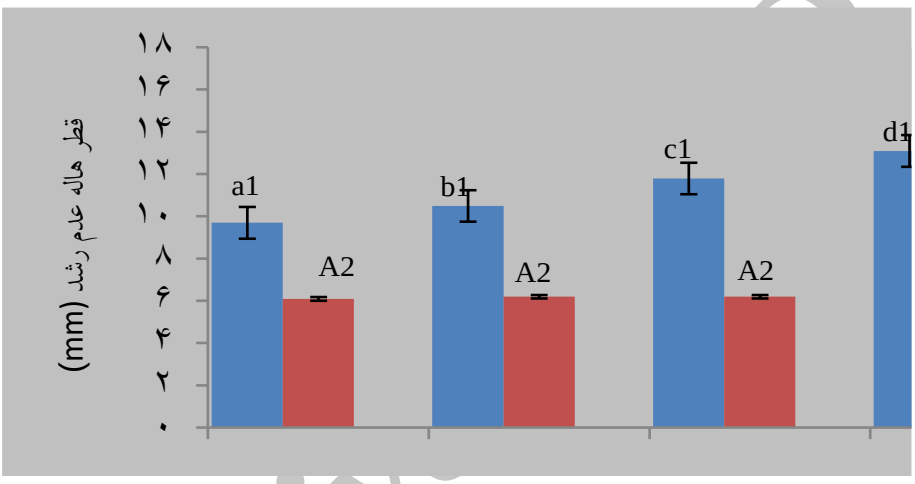


نمودار۲ – اثرضد باکتری همولنف جنس‌های نر و ماده میگو M.niponense بر باکتری Bacillus Subtilis. اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار می‌باشد.

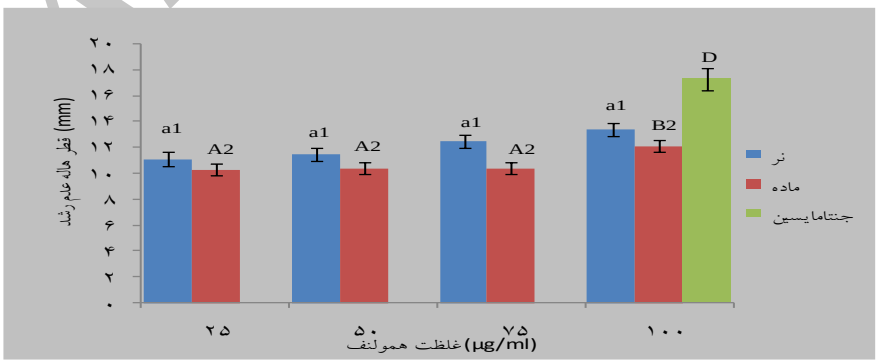
www.SID.ir

در باکتری گرم مثبت باسیلوس سابتیلیس، بیشترین اثر ضدباکتری در همولنف جنس نر با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱٤/۲±۰/۳۱mm) و کمترین مقدار در همولنف جنس ماده در غلظت ۲۵ میکروگرم با قطر هاله عدم رشد ۵/۵mm±۰/۳۲ مشاهده گردید. (نمودار۲) در فعالیت ضد باکتریایی همولنف در دو جنس نر و ماده اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. (P< ۰/۰۵)

در باکتری گرم منفی اشترشیا کلی همولنف حاصله از جنس نر میگوی آب شیرین نسبت به همولنف جنس ماده اثر ضد باکتری بیشتری را نشان داد (نمودار۳). اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت ضدباکتری بین غلظت‌های مختلف در همولنف جنس ماده مشاهده نگردید. (P> ۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری بین آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین با غلظت‌های مختلف از همولنف در دو جنس نر و ماده مشاهده گردید (P< ۰/۰۵).



نمودار۳ – اثرضد باکتری همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای M.niponense بر باکتری Escherchia coli. اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر وحروف بزرگ در جنس ماده) واعداد مختلف نشان دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمارمی باشد.

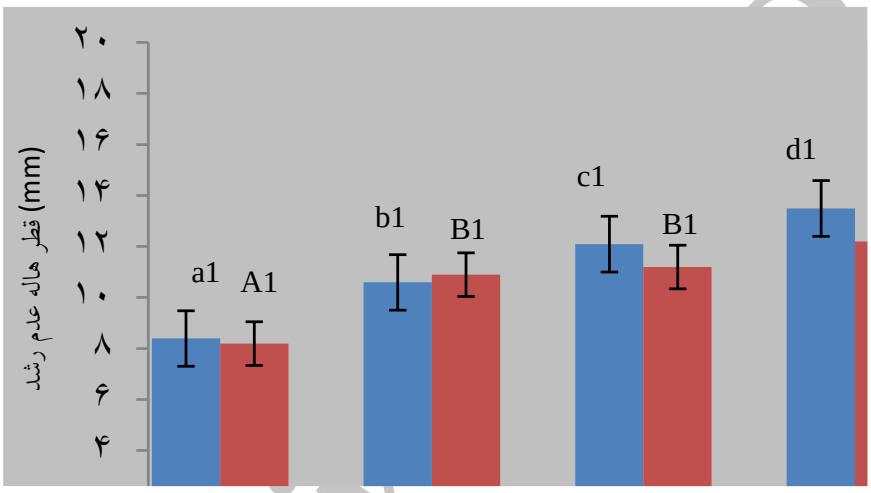


نمودار٤– اثرضد باکتری همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای M.niponense بر باکتری Kelbsila pneumonia اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده (حروف کوچک در جنس نر و حروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان‌دهنده در اختلاف جنس‌های نر و ماده در هر تیمار می‌باشد.

www.SID.ir

بیشترین اثر ضدباکتریایی همولنف مربوط به جنس نر در باکتری کلبسیلا پنومونیه (نمودار٤) مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف همولنف در هر دو جنس و نیز با آنتی بیوتیک‌ها مشاهده گردید. (P< ۰/۰۵) ولی تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف همولنف از این حیث مشاهده نگردید(P>۰/۰۵).

در باکتری گرم منفی ویبریوکلره (نمودار۵) بیشتری اثر ضدباکتری را غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر (۱۳/۵±۰/۱٤) همولنف از خود نشان داد. اثر همولنف در غلظت‌های مختلف روی این باکتری در دو جنس نر و ماده دارای اختلاف معنی‌داری بوده است (P< ۰/۰۵).



نمودار۵- اثرضد باکتری همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی M.niponens بر باکتری Vibrio chlorae اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار±میانگین)، حروف مختلف نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف (حروف کوچک در جنس نر وحروف بزرگ در جنس ماده) و اعداد مختلف نشان دهنده تفاوت درجنس‌های نر و ماده در هر تیمارمی‌باشد.

بحث

در سال‌های اخیر، توجه بسیاری به پژوهش وتحقیق در زمینه فعالیت زیستی تولیدات طبیعی دریایی و کاربرد دارویی و پزشکی آنها شده است. در مطالعه حاضر ساختار همولنف میگوی M.nipponenese و اثرت ضدباکتریایی همولنف در دو جنس نر و ماده این میگو مورد بررسی قرار گرفت.

میزان پروتیئن همولنف در جنس‌های نر و ماده میگوی آب شیرین برابر با ۱/۸۲±۰/۳٤و۱/۲±۰/۵۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج مشابهی در مقادیر پروتیئن همولنف در خرچنگ D.dehaeni (۱/٦۵ .۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب در جنس نر و ماده) مشاهده گردید(۱۸). میزان پروتئین نیز در گونه P. segnis به ترتیب برابر با ۱۱/۸ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر یه ترتیب در جنس نر و ماده گزارش شده است(۸).

الگوی الکتروفورز همولنف میگوی M.nipponenes در هر دو جنس نر و ماده، حضور پپتیدهایی با وزن مولکولی ۱۸ kDa تا ۹۰ را نشان داد. وجود چنین پپتیدهایی در سایر مطالعات نیز تایید شده است (۷،۲۰). چنانکه پپتیدهایی با اوزان ۲۲ kDa، ٤۷، ٦۸، ۷٤، ۸٤ و ۹۱ در میگوی M. rosenbergi و حضور ۲ باند پروتئین در هموسیت میگو L. vanamei با وزن ۷۳ kDa و ۷۵ شناسایی گردیده است(۲۰). در میگوهای خانواده پنانیده نیزحضور پپتیدها با خواص ضدباکتری در همولنف با ٤۷ تا ۷٤ اسید آمینه، مشخص شده است که حضور این پپتیدها در میگوی بیری سیاه (۲۰) در P. monoden (۱۵) و در میگوهای

www.SID.ir

L. vamamei ، L. setifeius مشاهده شده است (۵) حضور پلی پپتیدهای با خاصیت ضدقارچی در پلاسمای میگو P.vanama با وزن مولکولی حدود kDa ۲۷ و پپتیدهایی با وزن‌های Da ۸۰/٤ تا ۸۳/۸ در میگوی P. stylvostris مشاهده شد(۹).

از روش اسپکتوفتومتری FT-IR جهت شناسایی ترکیب و گروه‌های عاملی موجود در همولنف استفاده گردید. در طیف‌سنج مادون قرمز (FT-IR) همولنف M.nipponense حضور پیک در محدوده cm^{-1} ۱٦۱۰ تا ۱۷۰۰ که نشان دهنده ارتعاش کششی گروه آمید می‌باشد، به خوبی مشهود است. این ناحیه در استخراج همولنف از سایر سخت‌پوستان مانند خرچنگ Clibanarius clibanarius (۲۱) و خرچنگ Ocypode macrocera نیز گزارش شده است(۲۳). این باند شامل ۸۰٪ ارتعاشات کششی C=O که متصل به پیوند N-H خمشی داخل صفحه‌ای و کششی C=O می‌باشد، که نشان دهنده ساختار دوم پروتیین‌ها است. در مطالعه حاضر با توجه به گستردگی پیک در محدوده cm^{-1} ۱٦۵۹ احتمالا بیشترین درصد این ساختار متعلق به ساختار آلفا هلیکس و پیک‌های محدوده cm^{-1} ۱٦۲۳و۱٦۹۵ (۲۲/۵٪) ساختار کنفور ماسیون بتا را شامل می‌گردد (۲۳). حضور ترکیبات برمو، سولفونیک اسید، تری آزول وتیوفن که در طیف FTIR همولنف میگوی آب شیرین مشاهده می‌شود می‌تواند خواص ضد باکتری همولنف را توجیه نماید (۲۳) چنان‌که فعالیت‌های دارویی و درمانی ترکیبات تری آزول در همولنف بسیاری از سخت‌پوستان گزارش شده است(۲۲).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی باکتریایی بیشتری را همولنف میگوی M.nipponenes در هر دو جنس نر و ماده برعلیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (با قطر هاله عدم رشد mm ۱۵/۵±۰/۱۷و mm ۱۳/۸±۰/٤۳ به ترتیب) نسبت به سایر سویه‌های مورد مطالعه نشان دادند. فعالیت آنتی باکتریایی نسبتا بالایی در همولنف وموکوس‌های جداشده ازخرچنگ Bullacta exarata بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی گزارش شده است(۲٦). بیشترین فعالیت آنتی باکتری همولنف در گونه C. clibanarius. برعلیه باکتری ویبریو (V. parahaemolyticus) با قطر عدم هاله mm ۱۵/۱ مشاهده شده است (۱٦).

در بسیاری از مطالعات انجام شده در خصوص اثر همولنف بر روی ارگانیسم‌های پاتوژن، تاثیر بیشتر آنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری های گرم منفی گزارش شده است (۲٦و۲۰). علت این امر می تواند ناشی از حضور غشا خارجی (سد دفاعی) در باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزای هیدروفوبیک همولنف به لایه لیپو پلی ساکاریدی باکتری می‌شود(۲٦و۲۲).

در تحقیق حاضراختلاف معنی‌داری درمیزان مهار باکتریایی بر علیه برخی از سویه های پاتوژن در بین همولنف هردوجنس میگو مشاهده شد. بطوریکه همولنف در جنس ماده میگوی M.nipponense. فعالیت آنتی باکتریایی کمتری نسبت به جنس نر نشان داد. ساختار پپتیدهای ضدمیکروبی در میان یک گونه و در شرایط زیستی یکسان تا حدود زیادی به شکل یکسانی حفظ شده است (۲۳،۲٤،۳۰) به طوریکه در مطالعه انجام شده بر فعالیت ضدباکتری در هموسیت‌های جمع‌آوری شده از دو جنس نر و ماده میگو M.rosenbergi با یک نوع شرایط زیست محیطی، تفاوتی در فعالیت‌های ضدباکتری آنها مشاهده نگردید(۲۰). اما برخی از پارامترها مانند جنسیت، شرایط غذایی، چرخه زندگی ،بلوغ واندازه گونه وحتی عوامل فیزیکی مانند درجه حرارت می تواند بر میزان پروتیین‌های یک گونه ونیز فعالیت آنتی باکتریایی آنها تاثیر بگذارد(۸،۱٦).

تفاوت برون گونه‌ای نیز درمقدار نوع پروتیین‌ها در همولنف سخت‌پوستان مشاهده شده است.چنانکه در مطالعه انجام شده بر روی همولنف سخت‌پوستانی مانند Charybdi lucifera، خرچنگ ساحلی Carcinus maenas و خرچنگ‌های barachyuran تفاوت گسترده‌ای در مقدار پروتئین وفعالیت آنتی‌باکتریایی گزارش گردیده است (۲٤و۱٦).

www.SID.ir

در سخت‌پوستان، ترکیبات ضدباکتری پس از انجام پروسه‌هایی توسط گرانول‌های سیتوزولی در همولنف ذخیره می‌شوند و در زمانی که در معرض عفونت میکروبی قرار می‌گیرند به آزادسازی از همولنف آغاز می‌شود که در خرچنگ‌های Carcinusmeanas و Callinectes sapidos گزارش شده است(۲۰و۱۲).

مطالعه حاضر نشان داد که همولنف میگوی آب شیرین M. nipponense از قدرت ضدباکتری بیشتری نسبت به پروتئین همولنف برخوردار است. شاید دلیل این امر خصوصیات بافری و اجزای دیگر هموتنف (غیر از پروتئین) در افزایش خاصیت باکتری کشی آن باشد. تفاوت مشاهده شده در قدرت باکتری کشی همولنف وپروتئین آن می تواند ناشی از سمیت ذاتی همولنف در سخت پوستان نسبت به باکتری‌ها باشد (۱۶). سنجش میزان فعالیت ضدباکتری میگو M. nipponense می‌تواند اطلاعات پایه‌ای جهت مطالعه بیشتر در آینده را که همولنف این میگو قابلیت کاربری به عنوان ترکیب طبیعی با فعالیت‌های زیستی را دارد باشد. تحقیق و مطالعه درخصوص پپتیدهای همولنف می‌تواند زمینه را جهت شناسایی ترکیبات طبیعی با فعالیت دارویی جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها فراهم نماید بهرحال تخلیص بیشتر ترکیبات طبیعی جهت بررسی ساختار شیمیایی و ارزیابی آنها به عنوان دارو ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان به جهت فراهم نمودن امکانات برای اجرای پروژه قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

1. Baure, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, M.J.C., Turck, M. (1996): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol. 45:493-49.
2. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal .Biochem. 72:248-54.
3. Chisholm, J.R.S, Smith, V.J. (1992): Antibacterial activity in the hemocytes of the shore crab, Carcinusmaenas. J. Ma.r Biol .Assoc. U.K. 72: 529-42.
4. Chodsang, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Hara, K., Yoshida, A., Liang, X. (2012): Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (macrobrachiumrosenbergii):characteristics and biochemical properties. J. Food. Chem. 134:351-8.
5. Cuthbertson, B. J, Bullesbach, E.E., Gross, P.S. (2006): Discovery of synthetic penaeid in activity against antibiotic resistant. Chem. Biol .Drug Des .68:120-7.
6. De'Grave,S., Ghane, A. (2006) :Theestablishment of the Oriental River Prawn, Macrobrachium nipponense(de Haan, 1849) in Anzali Lagoon, Iran. Aquat. Invasions. 1(4):204-208.
7. Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, V. A., Rodriguea, J., Bachere, E. (1997): Penaedine a new family or antimicrobial peptides isolated from the shrimp penaeus vannamei(Decapoda). J. Biol. Chem.; 72: 28398-406.
8. Hajirasouli, M., Pazooki,J. (2014) :Antimicrobial potential of haemolymph and hepatopancreas of portunussegnis crabs . Int. J .Pharm. Pharm .Sci. 6(8): 601-603.
9. Kawababa, S.I., Nagayama, R., Hirata, M., Shigenaga, T., Agarwala, K.L., Saito, T. (1996):Tachykinin, a small granular component in horseshore crab hemocytes is an antimicrobial protein with chitin-binding activity. J. Biochem. 120:1253-60.
10. Kim, J.K., Kraemer G.P., Neefus, C.DChung. I.K., Yarish, C. (2007): Development and biologicalactivities of marine derived bioactive peptides. J. Funct. Foods. 2(1): 1-9.
11. Laemmle, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Archive of SID
www.SID.ir

12. Li, Y., Su, X.R., Li, T.W. (2005): Study onantimicrobial peptides from Bullacta exarata. J. Ocean Taiwa. 24: 145-149.
13. Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B. (2004): Invertebrateimmune systems—not homogeneous, not simple,not well understood. Immunol Rev. 198:10–24.
14. Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y. (1998): Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesinmII and polyphemisinsI and II:chemical structures and biological activity. J. Biochem. 106:663-8.
15. Noga, E.J., Arroll, T.W., Fan, Z. (1996): Specificity and some physiochemical characteristics of the antibacterial activity from the blue crabs Callinectes sapidus. Fish Shellfish Immunol . 6(6):403-12.
16. Priya, E.R., Kohilam , Ravichandran S. (2015):Antimicrobial activity from the hemolymph of the hermit crab Clibanarius clibanarius (Herbst 1791). World. J. Fish. Mar .Sci . 7 (4): 263-267.
17. Rameshkurmar, G.S., Ravichandran, M., Kaliyavarathan, G., Ajithkumar,T.T. (2009) :Antimicrobial peptide from the crab, Thalamitacrenata(Latreille, 1829). World J.Fish Mar Sci .1(2):74-9.
18. Rameshkumar, G., AravindhanT., Ravichandran, S. (2009) :Antimicrobial proteins from the crab Chrybdislucifera(Fabricius, 1798). MiddleEast J of SciRes .4(1):40-3.
19. Ravichandran, S.S., Wahidulla, L. D., Souza, Rameshkumar, G. (2010) Antimicrobial lipids from the hemolymph of brachyuran crabs. J. Appl. Biochem. Biotechnol .162(4):1039-51.
20. Ravichandran, S., Jeyalakshmi , S., Sudha, S., Anbuchezhian, R.(2010): Antimicrobial peptides from the haemolymph of the prawn Macrobrachium rosenbergii. Bangladesh J Pharmocol . 5: 62–67
21. Ravichandran, S., Sivasubramanian, K., Anbuchezhian, R.M. (2010): Antimicrobial activity the hemolymph of crab Ocypoda macrocera. J. Wor. Appl. Sci. 11: 578-581
22. Smith V.J., Chisholm, J.R. (2001): Antimicrobial protein in crustaceans. J. Adv .Exp. Med. Biol. 484:95-112.
23. Soundrapandian, P. (2009): Nutritive value of hard and soft shell crabs of Portunus sanguinolentus (Herbst). Int J Anim Vet Adv. 1(2): 44-48. 24. Soundarapandian, P., Ananthan, G. (2008): Effect of unilateral eyestalk ablation and diets on the biochemical composition of commercially important juveniles of Macrobrachium malcomsonii (H. Milne Edwards). Int. J. Zool. Res. 4(2): 106-112.
25. Stewart, J. E., Zwicker, B. M. (1972): Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster; Homarus americanus: products of hemocyte-plasma interactions. Can. J. Microbiol. 18:1499–1509.
26. Tincu, J.A., Taylor, S.W. (2004): Antimicrobial peptidesfrom marine invertebrates. Antimicrob. Agents Chemother. 48(10): 3645-3654.
27. Veeruraj, A., Ravichandran,S., Rameshkuma,G. (2008):Antibacterial activity of crab hemolymph on clinical pathogens. J Trend in Applied Sci Res. 3: 174-81.
28.Wang, Y., Tang ,T., Gu, J., Li, X., Yang, X., Gao, X., Liu, F., Wang, J. (2015): Identification of five anti-lipopolysaccharide factors in oriental river prawn, Macrobrachium nipponense, Fish & Shellfish Immunol. 46(2): 252–260.
29. Youqin, K., Liqiao, C., Zhili, D. (2016): Molecular cloning, characterization, and mRNA expression of hemocyanin Subunit in Oriental River Prawn Macrobrachium nipponense. Int. J. Genomics. 13: 6404817.
30. Zhao, D., Song, S., Wang, Q., Zhang, X., Hu, S., Chen, L. (2009): Discovery of immune-related genes in chinese mitten crab (Eriocheir sinensis) by expressed sequence tag analysis of haemocytes," Aquaculture. 287(3-4): 297–303.

www.SID.ir