

## اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha*

مریم افتخاری<sup>۱</sup>، اعظم مشفق<sup>۲\*</sup>، محبوبه سترکی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: آبان ۹۶

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۷

### چکیده

هدف این مطالعه، بررسی فعالیت ضدباکتریایی هیدرولیز آنزیمی و عصاره استخراج شده از دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha* بود. نمونه‌های پودر شده قسمت‌های نرم بدن جانور برای تهیه عصاره‌های متانولی، اتانولی، کلروفرمی و هیدرولیز آنزیمی آلکالاز مورد استفاده قرار گرفت. اثر ضدباکتریایی این عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم منفی *Proteus vulgaris* و *Klebsiella pneumoniae* و گرم مثبت *Enterococcus faecalis* به روش انتشار دیسک و اندازه‌گیری هاله عدم رشد، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها تعیین شد. از نظر اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی، *D. polymorpha* اثر ضدباکتریایی قوی‌تری در مقایسه با *A. cygnea* علیه باکتری‌های *P. vulgaris* و *K. pneumoniae* نشان داد. هر چند که عصاره‌های *A. cygnea* علیه *E. faecalis* موثرتر بود. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای *D. polymorpha* اثرات ضدباکتریایی قوی‌تری علیه باکتری‌های *P. vulgaris* و *K. pneumoniae* و عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی *A. cygnea* اثرات قوی‌تری علیه باکتری *E. faecalis* نشان داد. خالص‌سازی ترکیبات موثر عصاره‌های مورد مطالعه و مکانیسم‌های ضدباکتریایی آن‌ها در مطالعات آینده می‌تواند به درک بهتر و بهینه‌سازی عملکرد و استفاده از این ترکیبات طبیعی در مهار باکتری‌های مذکور منجر شد.

**واژگان کلیدی:** دوکفه‌ای، ضد میکروبی، MIC، *Anodonta cygnea*، *Dreissena polymorpha*

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، واحداهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، واحداهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحداهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران.

\* نویسنده مسئول: [moshfeghazam@gmail.com](mailto:moshfeghazam@gmail.com)

## مقدمه

طیف وسیع عملکردی علیه عوامل مختلف بیماری‌زا و همچنین هدف قرار دادن غشاهای میکروبی به عنوان مکانیسم عمده فعالیت این پپتیدها اشاره کرد. همچنین از ویژگی‌های عمده پپتیدهای ضد میکروبی این است که باکتری‌ها توانایی ایجاد مقاومت در برابر آن‌ها را ندارند (Hancock and Sahl, 2006; Matyus et al., 2007). این ویژگی‌ها باعث جلب نظر پژوهشگران برای استفاده از این پپتیدها علیه باکتری‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا شده است.

با توجه به این که زندگی در دریا سابقه بیشتری نسبت به زندگی در خشکی دارد، آبزیان فرصت بیشتری برای ایجاد تکامل در خود برای مواجهه با شرایط گوناگون داشته‌اند، از این رو به نظر می‌رسد این موجودات به ویژه گونه‌های کم تحرک‌تر می‌توانند حاوی ترکیبات مفید مانند انواع پپتیدهای ضد میکروبی باشند (Malve, 2016). صدف‌های دوکفه‌ای از ماکروفون‌های غالب اکثر اکوسیستم‌های مصبی، دریایی و آب شیرین هستند. دوکفه‌ای‌ها مصرف‌کنندگان مهم تولیدات اولیه فیتوپلانکتونی هستند و در نتیجه می‌توانند به تراکم خیلی بالا برسند. صدف‌های دوکفه‌ای زبرا

باکتری‌ها و قارچ‌ها سالانه باعث ایجاد مرگ و میر، مشکلات مرتبط با سلامتی و همچنین خسارت‌های اقتصادی ناشی از فساد مواد غذایی می‌شوند (Zasloff, 2002a). استفاده روزافزون از ترکیبات ضد میکروبی، آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های مواد غذایی که به صورت مصنوعی تولید شده‌اند، زمینه را برای ایجاد سویه‌های مقاوم فراهم کرده است که ضرورت پژوهش و معرفی انواع جدیدی از ترکیبات ضد میکروبی را نشان می‌دهد. در بین انواع ترکیبات معرفی شده در این زمینه، پپتیدهای ضد میکروبی دارای پتانسیل بالایی برای جایگزینی داروهای آنتی‌بیوتیکی متداول هستند (Zasloff, 2002b). پپتیدهای ضد میکروبی، پلی‌پپتیدهایی با حدود ۱۰۰ آمینواسید هستند که جزء ترکیبات مهم سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی انسان و جانوران محسوب می‌شوند و به عنوان یک سیستم دفاعی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zasloff, 2006; 2002a). پپتیدها در فرآیندهای مهمی مانند ایجاد پاسخ ایمنی و همچنین در فرآیندهای ایمونولوژیکی و فیزیولوژیکی نقش بسیار مهمی دارند. از ویژگی‌های پپتیدهای ضد میکروبی می‌توان به

کفه‌ای که در سواحل دریای خزر به فراوانی یافت می‌شوند مطالعه جامعی انجام نشده است. از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای‌های *A. cygnea* و *D. polymorpha* انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع‌آوری نمونه‌ها

دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* از رودخانه‌های حوضه جنوبی دریای خزر و *Dreissena polymorpha* از سواحل جنوبی دریای خزر جمع‌آوری شد و پس از شستشو با آب دریا به وسیله جعبه‌های حاوی لایه‌های یخ به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان انجام آزمایش به صورت منجمد ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) نگهداری شد (Sugesh and Mayavu, 2013).

##### آماده‌سازی و عصاره‌گیری

عصاره‌گیری طبق روش Sharma و همکاران (۲۰۰۹) و با استفاده از سه حلال مختلف شامل اتانول، متانول و کلروفرم انجام شد. به این ترتیب که ابتدا صدف‌ها شکسته شد و پس از جداسازی قسمت‌های نرم بدن، نمونه‌ها توسط فریز درایر (Dorsa Tech, ایران) خشک و سپس پودر شدند. پودر به

*(Dreissena polymorpha)* و *Anodonta cygnea* از گونه‌هایی هستند که در آب‌های حوزه دریای خزر به فراوانی زیست می‌کنند. صدف دوکفه‌ای *A. cygnea* از خانواده Unionidae، دارای صدفی بزرگ، گرد، تخم مرغی، گوشه‌دار، دارای دیواره نازک، ترد و شکننده، سبز همراه با خطوط قهوه‌ای، دارای شیارهای واضح و لایه‌های رشد آشکار است (Zare and Youneszadeh, 2010). صدف دوکفه‌ای زیرا *(D. polymorpha)* متعلق به خانواده Dreissenidae است که کلنی‌های مترامی را روی بسترهای سخت متنوعی در آب‌های شیرین و لب‌شور از جمله آب‌های حوضه دریای خزر تشکیل می‌دهد. این صدف دارای پوسته مثلثی زرد مایل به قهوه‌ای دارای نوارهای تیره و روشن است (Rahnama et al., 2011). همچنین این گونه‌ها پتانسیل بالایی را برای سازگار شدن و زیستن در اکوسیستم‌های جدید دارند و مقاومت خوبی را در برابر عوامل بیماری‌زای موجود در این محیط‌ها نشان می‌دهند که نشانه کارآمد بودن سیستم دفاعی و وجود ترکیبات مفید در آنها علیه این عوامل بیماری‌زا است (Xu and Faisal, 2010). تا کنون در رابطه با خصوصیات ضد میکروبی ترکیبات بدن نرم‌تنان شامل صدف‌های دو

سنجش فعالیت زیستی عصاره‌ها و پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز آنزیمی در مطالعه حاضر سه گونه باکتری بیماری‌زا شامل *Proteus*، *Enterococcus faecalis* و *Klebsiella pneumoniae vulgaris* برای سنجش فعالیت زیستی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک و تعیین MIC و MBC برای باکتری‌های مورد مطالعه انجام گرفت. در روش انتشار دیسک به طور خلاصه، سوسپانسیون‌های فعال باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت‌های ۰/۵ مک فارلند به وسیله کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس دیسک‌هایی که قبلاً به وسیله ۱۵ میکرولیتر از عصاره‌های مختلف با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بارگذاری شده بودند، روی محیط کشت‌های فوق تعبیه شدند و پس از گرمخانه‌گذاری ناحیه بازدارندگی رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. همچنین از حلال‌های مورد استفاده به عنوان شاهد منفی و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک نیز به عنوان شاهد مثبت استفاده شد (Nagashima et al., 2003; Pan et al., 2003).

دست آمده به نسبت ۱:۱ (وزنی- حجمی) با حلال‌های فوق به مدت یک ساعت سوکسله (PSU-500، جهان شیمی گستر اصفهان، ایران) شد. عصاره‌های به دست آمده برای آزمایش سنجش فعالیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت (Sharma et al., 2009). برای تهیه هیدرولیز آنزیمی، بافت نرم دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه به وسیله دستگاه چرخ گوشت هموژن شد. سپس به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های درونی، نمونه‌ها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و به نسبت ۲:۱ (وزنی- حجمی) با محلول بافر فسفات رقیق شدند. بعد از هموژن‌سازی به وسیله سود ۰/۲ نرمال، pH مخلوط به ۸/۵ که بهینه آنزیم آلکالاز است رسانده شد. به منظور قطع واکنش آنزیمی نیز نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شدند. نمونه‌ها پس از سرد شدن، در ۸۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf, 5702، آلمان) شدند و مایع رویی برای بررسی اثرات ضدباکتریایی جمع‌آوری شد (See et al., 2011).

کشندگی (MB) باکتری‌ها در نظر گرفته شد (Madhumathi et al., 2011).

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در تیمارهای مختلف از آزمون Kolmoorov-Smirnov استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و متعاقب آن پس‌آزمون دانکن برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها استفاده شد. همچنین از آزمون Independent Sample T-Test برای مقایسه دو گروه استفاده شد. سطح اطمینان ۹۵٪ ( $P < 0.05$ ) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### نتایج

جدول ۱ نتایج مربوط به اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha* تعیین شده به وسیله قطر ناحیه بازدارندگی رشد، MIC و MBC را نشان می‌دهد. عصاره متانولی *A. cygnea* در مقایسه با *D. polymorpha* به طور معنی‌داری اثر ضدباکتریایی قوی‌تری

برای تعیین MIC (حداقل غلظت ممانعت کشندگی) برای هر عصاره به ازای هر باکتری از روش رقت لوله‌ای مایع (Broth Dilution Test) استفاده شد. بدین ترتیب که به لوله اول به میزان ۵ میلی‌لیتر از محیط نوترینت براث و یک میلی‌لیتر از عصاره‌های مورد نظر اضافه شد و از این لوله رقت‌های متوالی تا رقت ششم (۶ لوله برای تهیه رقت عصاره) تهیه شد. سپس به تمامی لوله‌ها به جز شاهد منفی، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. یک لوله عنوان شاهد مثبت (محیط براث + باکتری)، یک لوله به عنوان شاهد منفی (محیط براث) و یک لوله به عنوان کنترل کارایی آنتی‌بیوتیک (محیط براث + باکتری + آنتی‌بیوتیک) در نظر گرفته شد. پس از گرمخانه‌گذاری، آخرین لوله‌ای که هیچ کدورت رشدی در آن دیده نشد به عنوان حداقل غلظت ممانعت کشندگی رشد (MIC) در نظر گرفته شد. همچنین تمام لوله‌های فاقد کدورت رشد برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مورد نظر به روش پور پلیت کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها، آخرین غلظتی که قادر به از بین بردن ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها شد به عنوان حداقل غلظت

علیه باکتری *Klebsiella pneumoniae* نشان داد، به طوری که میزان MIC و MBC برای *D. polymorpha* در غلظت ۱/۲۵mg/mL مشاهده شد در حالی که برای *A. cygnea* میزان MIC و MBC در غلظت ۵mg/mL مشاهده شد (جدول ۱). برای باکتری *Proteus vulgaris* نیز عصاره متانولی *D. polymorpha* در مقایسه با *A. cygnea* اثر ضدباکتریایی قوی تری را نشان داد، به طوری که میزان MIC و MBC به دست آمده برای *D. polymorpha* در مقایسه با *A. cygnea* (۱۰mg/mL) تایید کننده این اثرات بود (جدول ۱). برای باکتری *Enterococcus faecalis* عصاره متانولی *A. cygnea* اثرات قوی تری را نشان داد به طوری که میزان MIC (۲/۵mg/mL) و MBC (۲/۵mg/mL) عصاره *A. cygnea* کمتر از میزان MIC (۲/۵mg/mL) و MBC (۵mg/mL) عصاره *D. polymorpha* بود (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی دو کفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha*

MBC	MIC	قطر هاله (mm) در رقت‌های مختلف (mg/mL)							عصاره متانولی دو کفه‌ای در مقایسه با آنتی‌بیوتیک	گرم +/-	باکتری‌ها
		۰/۳	۱/۲۵	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰			
۵	۲/۵	-	-	۲/۵	۸/۷	۱۱	۱۸/۷	<i>D. polymorpha</i>	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	
۲/۵	۲/۵	<۱	۵*	۶/۷*	۱۲/۴*	۱۹/۷*	۲۰/۷*	<i>A. cygnea</i>			
			۱۶					آمپی‌سیلین			
۵	۵	-	۱/۸	۴/۴*	۷*	۱۱*	۱۰/۴	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	
۱۰	۱۰	-	-	-	۲/۵	۵/۴	۹/۷	<i>A. cygnea</i>			
			۱۷					جنتامایسین			
۱/۲۵	۱/۲۵	۴/۴*	۶/۴*	۹/۴*	۹/۴*	۱۸/۴*	۱۶/۴*	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
۵	۵	-	-	۲/۸	۵/۴	۱۰/۷	۱۲	<i>A. cygnea</i>			
			۱۵					جنتامایسین			

\*: علامت ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

نتایج مربوط به اثرات ضدباکتریایی عصاره اتانولی دوکفه‌ای‌های *A. cygnea* و *D. polymorpha* تعیین شده به وسیله قطر ناحیه بازدارندگی رشد، MIC و MBC در جدول ۲ نشان داده شده است. عصاره اتانولی *D. polymorpha* در مقایسه با *A. cygnea* اثرات ضدباکتریایی قوی‌تری را علیه باکتری‌های *K. pneumoniae* و *P. vulgaris* نشان داد، در حالی که عصاره اتانولی *A. cygnea* علیه باکتری *E. faecalis* موثرتر بود (جدول ۲). نتایج به دست آمده برای مقادیر MIC و MBC در غلظت‌های پایین‌تر برای عصاره اتانولی *D. polymorpha* علیه باکتری‌های *P. vulgaris* و *K. pneumoniae* و در نقطه مقابل در غلظت‌های پایین‌تر برای عصاره اتانولی *A. cygnea* علیه باکتری *E. faecalis* نیز نتیجه‌گیری فوق را تایید کرد.

جدول ۲: مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha*

MBC	MIC	قطر هاله (mm) در رقت‌های مختلف (mg/mL)							عصاره اتانولی دوکفه‌ای در مقایسه با آنتی‌بیوتیک	گرم -/+	باکتری‌ها
		۰/۳۱۲۵	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۲/۷			
۵	۲/۵	۱/۷	۲	۵/۷	۹	۱۳/۴	۱۲/۷	<i>D. polymorpha</i>	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	
۲/۵	۲/۵	<۱	۲	۷*	۱۱/۷*	۱۶*	۱۵/۷*	<i>A. cygnea</i>			
			۱۶					آمبی سیلین			
۲/۵	۱/۲۵	<۱	*۲/۵	*۶	*۱۱/۴	*۱۶	*۱۸	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	
۵	۵	-	-	۵/۴	۹	۱۳/۴	۱۴	<i>A. cygnea</i>			
			۱۷					جنتامایسین			
۱/۲۵	۰/۶۲۵	*۲/۷	*۷	*۱۰	*۱۵	*۱۶	*۱۸	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
۱۰	۵	-	-	۲/۵	۴/۴	۸	۸/۷	<i>A. cygnea</i>			
			۱۵					جنتامایسین			

\*: علامت ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به اثرات ضدباکتریایی عصاره کلروفرمی دوکفه‌ای‌های *A. cygnea* و *D. polymorpha* تعیین شده به وسیله قطر ناحیه بازدارندگی رشد، MIC و MBC در جدول ۳ نشان داده شده است. عصاره کلروفرمی *D. polymorpha* در مقایسه با *A. cygnea* اثرات ضدباکتریایی قوی‌تری را علیه باکتری‌های *E. faecalis* و *P. vulgaris* نشان داد، در حالی که عصاره کلروفرمی *A. cygnea* علیه باکتری *K. pneumoniae* موثرتر بود (جدول ۳). نتایج به دست آمده برای مقادیر MIC و MBC در غلظت‌های پایین‌تر برای عصاره کلروفرمی *D. polymorpha* علیه باکتری‌های *E. faecalis* و *P. vulgaris* در نقطه مقابل در غلظت‌های پایین‌تر برای عصاره اتانولی *A. cygnea* علیه باکتری *K. pneumoniae* نیز نتیجه‌گیری فوق را تایید کرد.

جدول ۳: مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره کلروفرمی دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha*

MB C	MIC	قطر هاله (mm) در رقت‌های مختلف (mg/mL)						عصاره کلروفرمی دوکفه‌ای در مقایسه با آنتی‌بیوتیک	بakteriya	گرم -/+
		۰/۳	۱/۲۵	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۲/۵	۵			
۱۳/۴	۹/۷	-	-	۲/۷*	۷/۷*	۹/۷	۱۳/۴	<i>D. polymorpha</i>	+	<i>Enterococcus faecalis</i>
۱۰/۷	۱۰/۷	-	-	<۱	۵	۱۰/۷	۱۲/۴	<i>A. cygnea</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>
				۱۶				آمپی‌سیلین		
۸/۷	۸	-	-	-	۲	۸*	۸/۷	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>
۸/۷	۸/۷	-	-	-	۲/۴	۵/۷	۸/۷	<i>A. cygnea</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>
				۱۷				جنتامایسین		
۷	۷	-	-	-	۶/۴	۷	۱۲	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
۱۲	۷/۴	-	-	۲*	۷/۴	۱۲*	۱۳/۷	<i>A. cygnea</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
				۱۵				جنتامایسین		

\*: علامت ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).



جدول ۴ نتایج مربوط به اثرات ضدباکتریایی هیدرولیز آنزیمی *A. cygnea* اثرات قوی‌تری را نشان داد (جدول ۴). میزان MIC و MBC هیدرولیز آنزیمی *D. polymorpha* علیه باکتری *P. vulgaris* به ترتیب در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۲/۵ و برای هیدرولیز آنزیمی *A. cygnea* به ترتیب در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ ثابت شد. میزان MIC و MBC برای هر دو گونه مورد مطالعه علیه باکتری *E. faecalis* در غلظت ۵ مشاهده شد.

جدول ۴: مقایسه اثر ضدباکتریایی هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha*

MBC	MIC	قطر هاله (mm) در رقت‌های مختلف (mg/mL)						عصاره هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای در مقایسه با آنتی‌بیوتیک	گرما -/+	باکتری‌ها
		۰/۳	۰/۶	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰			
۵	۵	-	<۱	۲	۶/۷	۸/۷	۱۳/۷	<i>D. polymorpha</i>	+	<i>Enterococcus faecalis</i>
۵	۵	-	-	۱/۳۳*	۷	۱۲/۷*	۱۸/۴*	<i>A. cygnea</i>	-	آمیسیلین
۲/۵	۱/۲۵	۱/۴	۳*	۱۰/۴*	۱۶/۴*	۱۸/۷*	۲۴*	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>
۵	۲/۵	-	۱/۴	۴	۷	۱۲/۷	۱۹/۷	<i>A. cygnea</i>	-	جنتامایسین
۲/۵	۱/۲۵	۱/۴	۲/۷	۹	۱۳	۱۷	۱۷/۷	<i>D. polymorpha</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
۱۰	۵	-	-	<۱	۲/۷	۷/۴	۱۱	<i>A. cygnea</i>	-	جنتامایسین

\*: علامت ستاره نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

## بحث

*D. polymorpha* فعال تر بود. اما عصاره *A. cygnea* اثرات بازدارندگی قوی تری را علیه *K. pneumoniae* نشان داد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر مبنی بر مشاهده اثرات ضدباکتریایی عصاره ها و هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه با نتایج سایر مطالعات که اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های گونه‌های آبی را گزارش کرده‌اند هم‌خوانی دارد. مطالعات مذکور گزارش کرده‌اند که عصاره‌های مختلف استخراج شده از بدن جانوران فعالیت ضدباکتریایی بالایی دارد که از جمله این مطالعات می‌توان به فعالیت ضدباکتریایی صدف سبز آسیا (*Perna viridis*) و صدف خوراکی (*Cerastoderma edule*) (Annamalai et al., 2007)، فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیداسیونی عصاره پپتیدی خام صدف‌های *Grevillea paradoxa* و *Patella rustica* (Borquaye et al., 2015) و فعالیت ضد میکروبی دوکفه‌ای‌های خوراکی *M. casta* و *Meretrix meretrix* (Sugesh and Mayavu, 2013) اشاره کرد.

خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای‌ها و نرم‌تنان به حضور اسیدهای آمینه و پپتیدها باز می‌گردد. همچنین دوکفه‌ای‌ها دارای چندین مولکول

عمده مطالعات انجام شده پیرامون ترکیبات و فعالیت ضدباکتریایی دوکفه‌ای‌ها بر *M. galloprovincialis*، *Mytilus edulis*، *Crassostrea gigas*، *Geukensia demissa* انجام شده است (Sharma et al., 2009). اما در مطالعه حاضر، اثر عصاره‌های استخراج شده به وسیله حلال‌های مختلف و همچنین هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha* مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده هاله بازدارندگی رشد برای باکتری‌های *Enterococcus faecalis* و *Proteus vulgaris*، *Klebsiella pneumoniae* موید اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای‌های *A. cygnea* و *D. polymorpha* بود که میزان این فعالیت بسته به نوع گونه دوکفه‌ای، نوع حلال و نوع باکتری متفاوت بود. به طوری که برای باکتری‌های *P. vulgaris* و *K. pneumoniae* عصاره‌های متانولی، اتانولی و هیدرولیز آنزیمی *D. polymorpha* اثر بازدارندگی قوی تری را نشان داد. اما عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی *A. cygnea* علیه *E. faecalis* قوی تر بودند. در مورد عصاره کلروفومی، برای باکتری‌های *P. vulgaris* و *E. faecalis* عصاره

نرم دوکفه‌ای‌های مورد مطالعه تهیه شد. همچنین با توجه به ساختار پروتئینی این عوامل ضد میکروبی سعی شد از روش‌هایی مانند استفاده از حلال در دمای پایین و همچنین هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. حلال‌های اتانول، متانول و کلروفرم کارایی بالایی در استخراج ترکیبات موثر دارند. همچنین پروتئین‌های پایدار در دمای اتاق نیز به راحتی به وسیله این حلال‌ها استخراج می‌شوند و تبخیر حلال نیز به سهولت انجام می‌شود. همچنین هیدرولیز آنزیمی نیز باعث تولید محدوده متنوعی از پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا تا پپتیدهای کوچک‌تر و همچنین آمینواسیدهای مختلف می‌شود که باعث بروز فعالیت ضد میکروبی این عصاره‌ها می‌شوند (Sharma et al., 2009).

همچنین نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مبنی بر اثر متفاوت عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی بسته به نوع گونه دوکفه‌ای، نوع حلال و گونه باکتری با نتایج مطالعه Borquaye و همکاران (۲۰۱۵) هم‌خوانی دارد. در مطالعه مذکور عصاره‌های *Grevillea paradoxa* درجات بالایی از فعالیت علیه باکتری‌های گرم منفی *Proteus vulgaris* و *Klebsiella pneumoniae* و گرم مثبت *Enterococcus*

دفاعی مانند آگلوتین‌ها و گلیکوپروتئین‌هایی هستند که فعالیت ضدباکتریایی دارند (Sugesh and Mayavu, 2013). همچنین فعالیت ضدباکتریایی عصاره خام پپتیدی می‌تواند به حضور تعداد مختلفی از پپتیدهای ضد میکروبی در آن‌ها مرتبط باشد که این پپتیدها می‌توانند اثرات هم‌افزایی (سینرژیست) و یا آنتاگونیست داشته باشند (Anderson and Beaven, 2001). همچنین ژن‌های مشابه با ژن‌های کد کننده پپتیدهای ضد میکروبی حشرات نیز در نرم‌تنان گزارش شده است که تولید این پپتیدهای ضد میکروبی نیز از دیگر مکانیسم‌های این جانداران علیه باکتری‌ها است. در همین راستا *D. polymorpha* که در پژوهش حاضر مورد مطالعه قرار گرفت دارای پپتید ضد میکروبی دیفنسین (*D. polymorpha* defensin (Dpd)) هستند و می‌توان فعالیت بالاتر ضدباکتریایی عصاره‌های مربوط به این گونه در مقایسه با *A. cygnea* را به حضور این پپتید ضد میکروبی نسبت داد (Xu and Faisal, 2010). هموسیت، بافت‌های اپیتلیال، بافت‌های اندام‌های تنفسی و گوارشی نرم‌تنان منبع خوبی از پپتیدهای ضد میکروبی هستند (Sharma et al., 2009) و در مطالعه حاضر نیز عصاره‌گیری و هیدرولیز آنزیمی از کل بافت

تخلیص و بررسی مکانیسم ضدباکتری ترکیبات موثر موجود در این عصاره‌ها فراهم کرده است. همچنین خواص ضد میکروبی عصاره‌ها، تحت تاثیر نوع گونه دوکفه‌ای مورد مطالعه، روش استخراج و ماهیت حلال‌های مورد استفاده بود. به طور کلی نتایج نشان دهنده پتانسیل دارویی این نرم‌تنان بود که در نهایت پس از انجام پژوهش‌های جامع‌تر می‌تواند به عنوان عوامل ضد میکروبی مفید بالینی، استفاده شود.

#### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر دستاورد پایان‌نامه کارشناسی ارشد است و بدین وسیله مولفین این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان سپاسگزاری می‌کنند.

*faecalis* را نشان داد هر چند که علیه قارچ *Candida albicans* غیرفعال بود. در مقابل *Patella rustica* به طور قابل توجهی فعالیت ضدقارچی بالاتری را نشان داد اما فعالیت ضدباکتریایی آن کمتر بود (Borquaye et al., 2015).

به طور کلی نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشانگر این بود که عصاره‌ها و هیدرولیز آنزیمی دوکفه‌ای‌های *Anodonta cygnea* و *Dreissena polymorpha* دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی بودند. هر چند در مجموع *D. polymorpha* اثر ضدباکتریایی قوی‌تری در مقایسه با *A. cygnea* نشان داد. نتایج به دست آمده در این مطالعه اطلاعات خوبی را برای مطالعات آینده با هدف جداسازی،

## منابع

- Anderson R.S. and Beaven A.E. 2001.** Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. Aquatic Living Resources, 14(6): 343–349.
- Annamalai N., Anburaj R., Jayalaksmi S. and Thavasi R. 2007.** Antibacterial activities of green mussel (*Perna viridis*) and edible oyster (*Crassostrea madrasensis*). Research Journal of Microbiology, 2(12): 978–982.
- Borquaye L.S., Darko G., Ocansey E. and Ankomah E. 2015.** Antimicrobial and antioxidant properties of the crude peptide extracts of *Galatea paradoxa* and *Patella rustica*. Springer Plus, 4(500): 1–6.
- Hancock R.E. and Sahl H.G. 2006.** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature Biotechnology, 24(12): 1551–1557.
- 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, 2(3): 213–216.
- Malve H. 2016.** Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. Journal of Pharmacy and Bioallied Science, 8(2): 83–91.
- Matyus E., Kandt C. and Tieleman D.P. 2007.** Computer simulation of antimicrobial peptides. Current Medicinal Chemistry, 14(26): 2789–2798.
- Nagashima Y., Kikuchi N., Shimakura K. and Shiomi K. 2003.** Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. Comparative Biochemistry and Physiology (C), 136(1): 63–71.
- Pan C.Y., Rajanbabu V., Chen J.Y., Her G.M. and Nan F.H. 2010.** Evaluation of the epinecidin-1 peptide as an active ingredient in cleaning solutions against pathogens. Peptides, 31(8): 1449–1458.
- Rahnama R., Javanshir A. and Mashinchian A. 2011.** The effect of lead bioaccumulation on condition indices of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) from Anzali wetland-Caspian Sea. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11(4): 561–568.
- See S., Hoo L. and Babji A.S. 2011.** Optimization of enzymatic hydrolysis of salmon (*Salmo salar*) skin by alcalase. International Food

- Research Journal, 18(4): 1359–1365.
- Sharma S., Chatterji A. and Das P. 2009.** Effect of different extraction procedures on antimicrobial activity of marine bivalves: A comparison. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 32(1): 77–83.
- Sugesh S. and Mayavu P. 2013.** Antimicrobial activities of two edible bivalves *M. meretrix* and *M. casta*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(1): 38-43.
- Xu W. and Faisal M. 2010.** Defensin of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Molecular structure, in vitro expression, antimicrobial activity, and potential functions. *Molecular Immunology*, 47(11-12): 2138–2147.
- Zare P. and Youneszadeh B. 2010.** Studying growth and age structure of the freshwater mussel *Anodonta cygnea* (Linea, 1876), in three streams adjusted to Pasikhan river. *Journal of Fisheries*, 3(4): 63–72.
- Zasloff M. 2002a.** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870): 389–395.
- Zasloff M. 2002b.** Antimicrobial peptides in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 347(15): 1199–1200.
- Zasloff M. 2006.** Defending the epithelium. *Nature Medicine*, 12(6): 607–608.



## The antibacterial effect of solvent extracts and enzymatic hydrolysis from *Dreissena polymorpha* and *Dreissena polymorpha*

Maryam Eftekhari<sup>1</sup>, Azam Moshfegh<sup>2\*</sup>, Mahbubeh Setorki<sup>3</sup>

Received: November 2017

Accepted: June 2018

### Abstract

The aim of this study was to investigate the bioactivity of extract and enzyme hydrolysate extracted from *Anodonta cygnea* and *Dreissena polymorpha*. The powdered samples of soft parts of bivalves were used for the preparation of methanol, ethanol, chloroform extracts as well as enzyme hydrolysis. The antibacterial effects of these extracts were evaluated against gram negative *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* and gram positive *Enterococcus faecalis* using disc diffusion method and measuring the growth inhibition zone. In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the studied extracts were determined. Regarding the growth inhibition zone, the extracts and enzymatic hydrolysis of *D. polymorpha* showed greater antibacterial activity against *P. vulgaris* and *K. pneumoniae* compared to *A. cygnea* whereas *A. cygnea* was more efficient against *E. faecalis*. In conclusion, extracts and enzymatic hydrolysis of *A. cygnea* and *D. polymorpha* can be used as a valuable source with bioactive potential for producing antibacterial drugs.

**Key words:** *Bivalves*, *Antimicrobial*, *MIC*, *Anodonta cygnea*, *Dreissena polymorpha*.

1- M.Sc. in Marine Biology, Department of Marine Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Biology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh, Iran.

\*Corresponding Author: [moshfeghazam@gmail.com](mailto:moshfeghazam@gmail.com)

