



ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی فازهای استخراج شده از مایع سلومی توتیای دریایی نقبزن (*Echinometra mathaei*)

مجید موسی پور شاجانی^۱، سید فخرالدین حسینی^{۲*}، مسعود رضائی^۳، دومنیکو اسکیلچی^۴

تاریخ دریافت: شهریور ۹۸

تاریخ پذیرش: آبان ۹۸

چکیده

خارپوستان دریایی از جمله توتیاهای دریایی به دلیل زندگی در محیط‌های کم‌عمق که واجد شرایط مناسب برای رشد میکروب‌ها است از توانایی بالایی در حفظ بقای خود برخوردار هستند. با توجه به چنین ویژگی‌های منحصر به فردی، توجه زیادی به خالص‌سازی و شناسایی انواع مولکول‌های زیست‌فعال به ویژه پپتیدهای ضد میکروبی شده است. به همین سبب، در مطالعه حاضر مایع سلومیک توتیای دریایی نقبزن (*Echinometra mathaei*) به عنوان فراوان‌ترین گونه توتیای دریایی خلیج فارس مورد بررسی قرار گرفته است و با استفاده از حلال، دو فاز آبی و آلی از سلول‌های سلوموسیت جداسازی شدند. نتایج آزمایش انتشار از دیسک و حفره در محیط آگار نشان داد که فاز آلی خاصیت ضدباکتریایی قوی‌تری داشت که می‌تواند به محتوای پروتئینی آن مربوط باشد. فاز آلی در غلظت‌های بالاتر از ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مهار کامل بیوفیلیم باکتری و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز موجب تخریب کامل آن شد. فاز آلی فاقد فعالیت همولیتیک در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و حتی بر همولیز گلبول‌های قرمز خون توسط باکتری‌ها نیز اثر بازدارندگی داشت. با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌شود فاز آلی استخراج شده از سلوموسیت توتیای دریایی نقبزن برای استخراج و شناسایی ترکیبات ضد میکروبی مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: توتیای دریایی، *Echinometra mathaei*، فعالیت ضدبیوفیلمی، سلوموسیت.

۱- دانشجوی دکتری شیلات- عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۲- دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۳- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده شیمی و علوم و فن‌آوری دارویی، دانشگاه پالمو، پالمو، ایتالیا.

* نویسنده مسئول: hosseinif@modares.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، ایدز و سرطان مطرح هستند و در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری که به مرور زمان مقاومت باکتریایی را در بردارند، چنین مشکلی در مورد این دسته از ترکیبات گزارش نشده است و از عوارض مصرف کمتری نیز برخوردار هستند (Zasloff, 2002; Wang, 2017).

دریاها و اقیانوس‌ها بیش از نیمی از سطح زمین را پوشش داده‌اند و منبع غنی و مناسبی برای کشف و شناسایی ترکیبات ضد میکروبی و دارویی هستند (Liang et al., 2019). خارپوستان یکی از کهن‌ترین و مهم‌ترین موجودات دریایی هستند که در بستر دریاها تقریباً از ناحیه جزر و مدی تا اعماق پراکنش دارند. تا کنون ترکیبات ضد میکروبی متنوعی شامل گلیکوزیدهای استروئیدی، رنگ‌دانه‌های نفتاکینونی و پپتیدهای ضد میکروبی از آن‌ها جداسازی و شناسایی شده که این دسته از موجودات را به عنوان منبع با ارزشی برای تامین ترکیبات دارویی و ضد میکروبی مطرح کرده است (Chiaromonte and Russo, 2015; Li et al., 2015). از جمله موجوداتی به شاخه خارپوستان تعلق دارند، توتیاهای دریایی (Sea Urchins) هستند. بدن آن‌ها از پوسته سخت

در چند دهه اخیر، موضوع مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجاری در انسان و دام مورد توجه قرار گرفته است و به عنوان یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های عمده بهداشتی در سراسر جهان مطرح است (Ventola, 2015; Krapp et al., 2018; Kumar et al., 2019). هم‌زمان با آن، پژوهش در زمینه شناسایی و استخراج ترکیبات زیست‌فعال از جمله پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides, AMPs) به عنوان جایگزین موثر به طور قابل توجهی افزایش یافته است (Boto et al., 2018; Gomes et al., 2018; Shagaghi et al., 2018) و در حال حاضر ۳۱۱۰ عدد از این نوع پپتیدها در بانک اطلاعاتی پپتیدهای ضد میکروبی ثبت و گزارش شده است (APD Database, 2019). پپتیدهای ضد میکروبی مولکول‌های گسترده‌ای در سیستم ایمنی داخلی مهره‌داران و بی‌مهرگان هستند و اثر ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی دارند که طی روند تکاملی موجودات، از آن‌ها در مقابل آسیب‌های محیطی محافظت به عمل آورده‌اند. به همین جهت، عامل برجسته‌ای در درمان بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های ناشی از

Strongylocentrotus droebachiensis نشان داده است که پوسته و سلوموسیت‌ها بیشترین خاصیت ضد میکروبی را دارند و مایع سلومی فاقد سلوموسیت، اثر ضدباکتریایی ندارد. در واقع فعالیت ضد میکروبی به وسیله پپتیدهای داخل سلول‌های سلوموسیت انجام می‌شود و نه در مایع سلومی (Haug et al., 2002a; Li et al., 2015). اولین توالی‌یابی کامل ژن کد کننده پپتیدهای ضد میکروبی در خارپوستان بر روی توتیای دریایی سبز *S. droebachiensis* انجام پذیرفت که از سلول‌های سلوموسیت آن استخراج شده بودند و به نام Strongylocins نام‌گذاری شدند (Li et al., 2008). در ادامه، پپتیدهای ضد میکروبی دیگری به نام Centrocins از این گونه گزارش شدند (Li et al., 2010b). پپتیدهای مشابهی نیز از گونه توتیای دریایی بنفش (*Strongylocentrotus purpuratus*) شناسایی شده‌اند (Li et al., 2010a). همچنین با توجه به این که بیوفیلیم‌های ایجاد شده توسط باکتری‌ها تاثیر منفی و اثرگذاری بر اقتصاد جهانی، بهداشت عمومی و درمان وارد کرده است (Chopra et al., 2015)، پپتیدهای دیگری نیز از گونه‌های توتیای دریایی با خاصیت ضدبیوفیلیم میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی شناسایی

آهکی پوشیده شده از خار تشکیل شده است. مخرج در بالا و دهان در قسمت پایین قرار گرفته است و ۵ ردیف دندان سخت دارند که توسط یک غشای نرم به نام غشای دهانی (Peristome) احاطه شده است. فضای داخلی بدن به نام فضای سلومی (Coelomic Cavity) توسط مایع سلومی (Coelomic Fluid) پر شده است و اندام‌های داخلی بدن شامل روده، گنادها، رشته‌های عصبی و سیستم عروقی-آبی در داخل آن، شناور هستند (نوربخش و عمادی، ۱۳۸۷). این مایع حاوی موادمعدنی، پروتئین و سلول‌های شناور به نام سلوموسیت (Coelomocyte) است که این سلول‌ها نقش بارزی در ایمنی بدن ایفا می‌کنند (Coffaro and Hinegardner, 1977; Bertheussen, 1981; Smith et al., 2006, 2010).

توتیاهای دریایی اغلب در منطقه بین جزر و مدی زندگی می‌کنند که این محیط‌ها از شرایط رشد میکروبی مناسبی برخوردار هستند و ممکن است در معرض سطح نسبتاً بالایی از تراکم میکروبی قرار گیرند. به همین سبب، بقای این موجودات به تولید ترکیبات موثر ضد میکروبی برای دفاع از خود در مقابل آلودگی میکروبی وابسته است. نتایج بررسی اثرات ضد میکروبی اندام‌های مختلف توتیای دریایی سبز

آنتی‌اکسیدانی مایع سلومی و سلوموسیت لیزات (عصاره مایع ناشی از متلاشی شدن سلول‌های سلوموسیت به روش التراسونیک) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاکی از آن بود که مایع سلومی فاقد سلول‌های سلوموسیت دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سلوموسیت لیزات دارای بیشترین فعالیت ضدباکتریایی بود (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۴ج؛ سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۵).

با توجه به وجود انواع گونه‌های ارزشمند در خلیج فارس و اهمیت کشف ترکیبات زیست‌فعال به ویژه ترکیبات ضد میکروبی و ضد بیوفیلم میکروبی برای استفاده در صنایع دارویی و غذایی و در ادامه مطالعات انجام شده بر روی مایع سلومی توتیای دریایی نقب‌زن، در مطالعه حاضر برای اولین بار، سلول‌های سلوموسیت که نقش بارزی در ایمنی این موجودات دارند، با استفاده از روش استفاده از حلال، تحت خالص‌سازی بیشتر قرار گرفتند و خواص ضدباکتریایی و ضد بیوفیلمی آن علیه باکتری‌های *Vibrio parahaemolyticus* و *Listeria monocytogenes* مورد بررسی قرار گرفت.

و تخلیص شده‌اند (Schillaci et al., 2010, 2012).

در ایران سه گونه توتیای دریایی از سواحل جنوبی گزارش شده است که گونه توتیای دریایی نقب‌زن (*Echinometra mathaei*) فراوان‌ترین آن‌ها است (خالقی و عوفی، ۱۳۸۹). در زمینه استخراج ترکیبات زیست‌فعال از این گونه مطالعات متعددی انجام شده است. نتایج مطالعات انجام شده بر روی بخش‌های مختلف بدن شامل گنادها، پوسته، خار و بخش دهانی (فانوس ارسطو) توتیای دریایی نقب‌زن در داخل کشور اثرات ضدباکتریایی (اصلیان و همکاران، ۱۳۹۴؛ شکوری و جوانمرد، ۱۳۹۴؛ شکوری و همکاران، ۱۳۹۴؛ راهی و همکاران ۱۳۹۶؛ Kazemi et al., 2016)، ضدقارچی (راهی و همکاران، ۱۳۹۳)، ضدالتهابی (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۴الف) و مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۴ب) را در این جانور نشان می‌دهد که با توجه به نوع حلال مورد استفاده در عصاره‌گیری، نتایج متفاوتی گزارش شده است. علاوه بر اندام‌های مذکور، در یک مطالعه صورت گرفته بر روی مایع سلومی و سلول‌های سلوموسیت، اثر ضدباکتریایی و

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه

نمونه‌های زنده توتیای دریایی نقبزن گونه *Echinometra mathaei* در فصل‌های پاییز و زمستان و طی چند مرحله از ساحل سنگی شهرستان بوشهر و در منطقه بین جزر و مدی صید شد و به صورت زنده به مخازن فایبرگلاس ایستگاه تحقیقاتی آبیان دانشگاه خلیج فارس منتقل، توزیع و نگهداری شدند. آب کارگاه به طور مستقیم از دریا تامین شد که پس از تصفیه و هوادهی به داخل مخازن کارگاه، هدایت و ریخته می‌شد. توتیاهای زنده تا زمان اتمام نمونه‌برداری در هر مرحله، در این مخازن نگهداری می‌شدند.

استخراج و خالص‌سازی مایع سلومی

پس از تهیه تعداد مناسب از توتیا (۷۰۰ عدد)، به صورت زنده، آن‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند تا مورد آزمایش قرار گیرند. ابتدا لوله‌های فالکن ۵۰ میلی‌لیتری استریل را داخل ظرف پلاستیکی حاوی پودر یخ گذاشته تا خنک شوند. سپس با استفاده از تیغ اسکالپل استریل، ناحیه دهانی هر کدام از توتیاها کمی برش داده شد و مایع سلومی موجود در فضای داخلی بدن جاندار به داخل لوله‌های فالکن تخلیه و به

سرعت با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار (Eppendorf, 5810R, آلمان) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (g ۸۰۰ و زمان ۲۰ دقیقه)، سلول‌های سلوموسیت رسوب و جداسازی شد (Haug et al., 2002b; Solstad et al., 2016). پس از پایان هر مرحله از سانتریفوژ، مایع رویی فاقد سلول دور ریخته شد و رسوبات ته‌نشین شده حاوی سلول‌های سلوموسیت جمع‌آوری شد. سپس سلوموسیت‌های جمع‌آوری شده با هم مخلوط شدند و به مدت ۱۲ ساعت در فریزر و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا منجمد شوند. سپس در خشک‌کن انجمادی (Freeze Dryer, Christ, آلمان)، رطوبت‌گیری و خشک شدند.

با استفاده از روش استخراج مایع-مایع (Liquid-Liquid Extraction) سلوموسیت‌های خشک شده به نسبت ۵ درصد (وزنی/حجمی) در استونیتریل ۶۰ درصد که حاوی ۰/۱ درصد تری‌فلورواستیک اسید (TFA) بود، مخلوط و خوب هم زده شدند. سپس محلول حاوی نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) گذاشته شد و پس از آن محلول تخلیه و از نمونه جدا شد. محلول ترکیبی به دست آمده حدود ۱ ساعت در فریزر و در دمای ۲۰- درجه

Listeria monocytogenes ATCC 13932 استفاده شد. باکتری *V. parahaemolyticus* به صورت لیوفیلیزه از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و باکتری *L. monocytogenes* به صورت کشت شده در محیط جامد از پژوهشکده شمال انستیتو پاستور ایران- آمل تهیه شد.

برای انجام آزمون‌های میکروبی از کشت ۲۴ ساعته باکتریایی استفاده شد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰rpm سانتریفوژ و مایع رویی پس از تخلیه، با محلول پپتون واتر استریل و یا محلول سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم جایگزین شد و با ورتکس مخلوط و همگن شد. به روش کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Jenway, 6305، انگلستان)، تراکم باکتری‌ها معادل 1×10^8 کلونی (Colony-Forming Unit, CFU) در هر میلی‌لیتر (1×10^8 CFU/mL) در طول موج ۶۲۵ نانومتر به دست آمد. به این صورت که عدد جذب نوری بین ۰/۱۲-۰/۰۸ (استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) معادل این مقدار در نظر گرفته شده و سپس رقت‌های سریالی از آن تهیه تا تراکم باکتری حاوی 10^6 باکتری در هر میلی‌لیتر

سانتی‌گراد قرار داده شد تا دو فاز آبی در پایین و استونیتریلی یا آلی در بالا تفکیک شوند. دو فاز در شیشه‌های مجزا ریخته و جمع‌آوری شد. سپس به مدت ۱۲ ساعت در فریزر و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه، فازهای مذکور در خشک‌کن انجمادی خشک و تا زمان استفاده، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Haug et al., 2002b; Solstad et al., 2016).

سنجش محتوای پروتئین

مقدار پروتئین نمونه‌های خشک شده شامل سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی به روش ارزیابی پروتئینی (Bicinchoninic Acid) BCA و با استفاده از کیت‌های تجاری (BCA Protein Quantification Kit، پارس‌توس، ایران) صورت پذیرفت و مقدار عددی آن بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Smith et al., 1985).

سویه‌های میکروبی و ارزیابی فعالیت‌های ضدباکتریایی

سویه‌های میکروبی و آماده‌سازی آن‌ها در این پژوهش از دو نوع باکتری گرم منفی *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (IBRC-M 10706) و گرم مثبت

مخلوط شد. دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر (پادتن طب، ایران) در هر کدام از رقت‌های ماده مورد نظر، قرار داده شد تا به آن آغشته شوند. سپس با فشار مختصر، بر روی سطح محیط کشت جامد MHA قرار داده شدند. از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام تجاری آغشته به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (Chloramphenicol)، غلظت ۳۰ میکروگرم در هر دیسک) نیز برای مقایسه استفاده شد. سپس پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (دمای 35 ± 2 درجه سانتی‌گراد). پس از انکوباسیون، قطر ناحیه مهار رشد که نشان‌گر قدرت مهارکنندگی بود، با خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (ایراجیان و همکاران، ۱۳۹۱؛ Balouiri et al., 2016).

آزمایش انتشار از حفره آگار

در روش انتشار از حفره آگار (Agar Well Diffusion) همانند روش انتشار از دیسک آگار، از کشت ۲۴ ساعته باکتریایی استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی با تراکم باکتری 1×10^6 CFU/mL بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از سوآب استریل به طور کامل پخش شد. سپس با ابتدای پیپت پاستور شیشه‌ای استریل، در محیط کشت حفره

(CLSI, 2012;) به دست آید (10^6 CFU/mL) (Balouiri et al., 2016).

آزمایش انتشار از دیسک در آگار

به منظور بررسی اولیه خاصیت ضد میکروبی نمونه‌های خشک شده شامل سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی یا استونیتریلی و تعیین حداقل غلظت مناسب ماده مورد نیاز برای آزمون‌های تکمیلی دیگر و مقایسه قدرت مهارکنندگی، از آزمایش انتشار از دیسک آگار (Agar Disk Diffusion) علیه دو سویه باکتریایی شامل *Vibrio* و *Listeria monocytogenes paraahaemolyticus* استفاده شد. به منظور انجام این آزمایش از محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) و از کشت ۲۴ ساعته باکتریایی استفاده شد. سویه‌های باکتری پس از رقت‌سازی (10^6 CFU/mL) با کمک سوآب (Swab) استریل به صورت سطحی و چمنی در سطح محیط کشت حاوی آگار به طور کامل گسترده شدند.

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نمونه‌های خشک شده از سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی ابتدا با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن و درون میکروتیوب‌های استریل حاوی آب دیونیزه ریخته شد و با استفاده از ورتکس، به خوبی

مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) در نظر گرفته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از اولین چاهک فاقد کدورت (MIC) و از چاهک‌های با غلظت بیشتر ماده مورد نظر، برداشته شد و بر روی محیط کشت MHA کشت سطحی داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، پلیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و کمترین غلظتی از ماده که باعث عدم تشکیل کلونی باکتری شد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) در نظر گرفته شد (ایراجیان و همکاران، ۱۳۹۱؛ Balouiri et al., 2016).

ارزیابی تشکیل بیوفیلم دو سویه باکتری مورد آزمایش

برای این منظور، ابتدا کشت ۲۴ ساعته از دو سویه باکتریایی *L. monocytogenes* و *V. parahaemolyticus* آماده و تراکم باکتریایی 10^6 CFU/mL تهیه شد. سپس سویه‌های باکتریایی مد نظر در چند تکرار و در چاهک‌های میکروتیتر پلیت کف تخت استریل، تلقیح و در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون شدند و با استفاده از روش رنگ‌آمیزی با محلول کریستال ویوله مورد

ایجاد شد و ۶۰ میکرولیتر از غلظت‌های مشخص ماده در هر یک از حفره‌ها وارد شد. پلیت‌ها در دمای 35 ± 2 درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از آن، قطر هاله مهار رشد با خط‌کش اندازه‌گیری شد (ایراجیان و همکاران، ۱۳۹۱؛ Balouiri et al., 2016).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی با استفاده از روش رقیق کردن در محیط مایع

غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از ماده مورد آزمایش در محیط کشت مولر هینتون برات استریل (MHB) و در میکروتیوب تهیه شد و رقت سریالی (یک‌دوم) از ماده در میکروپلیت ۹۶ خانه کف تخت استریل (SPL، کره جنوبی) ایجاد شد. کشت ۲۴ ساعته باکتریایی با رقت 10^6 CFU/mL تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون دو نوع باکتری در هر کدام از چاهک‌ها ریخته شده و با چاهک‌های فاقد ماده ضد میکروبی (شاهد مثبت) و چاهک‌های حاوی فقط محیط کشت (شاهد منفی) پس از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 35 ± 2 درجه سانتی‌گراد مقایسه شدند (Schillaci et al., 2005). اولین ردیف از چاهک‌های فاقد کدورت که حاوی ماده بودند به عنوان حداقل غلظت

ماده در میکروپلیت ۹۶ خانه کف تخت استریل ایجاد شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون دو سویه باکتری با تراکم 10^6 CFU/mL در هر کدام از چاهک‌ها ریخته و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای 35 ± 2 درجه سانتی‌گراد مقایسه شدند. چاهک‌های فاقد ماده ضد میکروبی (شاهد مثبت) و چاهک‌های حاوی فقط محیط کشت (شاهد منفی) به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

پس از دوره انکوباسیون، چاهک‌ها شستشو و با محلول کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو، میکروپلیت‌ها بر روی سطح صاف و به صورت وارونه در دمای محیط قرار گرفتند تا خشک شوند. با افزودن اسید استیک ۳۰ درصد، رنگ چسبیده به بیوفیلم میکروبی حل شد و سپس در طول موج ۵۴۰ نانومتر مقدار جذب توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده و با یکدیگر مقایسه شدند. اولین ردیف از چاهک‌های حاوی ماده که فاقد رنگ بودند و عدد جذب آن مشابه عدد جذب شاهد منفی بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تشکیل بیوفیلم میکروبی (Minimum Biofilm Inhibitor) در نظر گرفته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از اولین چاهک فاقد رنگ (MBIC) و از چاهک‌های با غلظت بیشتر ماده

ارزیابی قرار گرفتند. چاهک‌هایی که فقط با محیط کشت پر شده بودند به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. پس از دوره انکوباسیون، چاهک‌ها با استفاده از بافر فسفات نمکی (Phosphate-Buffered Saline: PBS) استریل طی سه نوبت و به آرامی شستشو شده، با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند و حدود ۱۵-۱۰ دقیقه در معرض آن قرار گرفتند. سپس با شستشوی آرام هر میکروپلیت، رنگ اضافه آن تخلیه شد و میکروپلیت‌ها در دمای محیط و به صورت وارونه قرار گرفتند تا خشک شوند. بعد از این مدت، به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰ درصد اضافه شد تا رنگ متصل شده به بیوفیلم میکروبی در آن حل شود. سپس در طول موج ۵۴۰ نانومتر مقدار جذب آن‌ها با دستگاه الیزا ریدر (Epoch، Biotek، آمریکا) خوانده و با یکدیگر مقایسه شدند.

ارزیابی اثر بازدارندگی فاز آلی بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های باکتری به روش کریستال ویوله غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از فاز آلی مورد نظر در محیط کشت MHB استریل و در میکروتیوب تهیه شد و رقت سریالی (یک‌دوم) از

انکوبه شد که طی این مدت، آنزیم‌های دهیدروژناز باکتری‌های زنده، باعث شکست ماده MTT و رسوب فورمازین بنفش غیرمحلول (Insoluble Purple Formazan) شدند. به هر کدام از چاهک‌ها، مخلوط ایزوپروپیل الکل و ترایتون X-۱۰۰ اضافه شد تا حل شوند. سپس در طول موج ۵۷۰ نانومتر مقدار جذب نوری با فیلتر پس‌زمینه ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (Schillaci et al., 2005; Schillaci et al., 2008).

ارزیابی اثر بازدارندگی فاز آلی بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های باکتریایی به روش فلورسانس مشابه روش کریستال ویوله، رقت‌های مختلف ماده به همراه محیط مایع حاوی باکتری در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه تلقیح و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای 35 ± 2 درجه سانتی‌گراد، محتویات چاهک‌ها با PBS استریل شستشو شد. سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۱ میکرومول در لیتر محلول فلورسانس SYTO 9 اضافه شد، در محیط تاریک به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و سپس در زیر میکروسکوپ اینورت فلورسانس (Nikon، Ti-S، ژاپن) مشاهده شد (Schillaci et al., 2008, 2010, 2012).

مورد نظر، برداشته و بر روی محیط‌کشت (MHA) کشت سطحی داده شدند. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، پلیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و کمترین غلظتی از ماده که باعث عدم تشکیل کلونی باکتری شد به عنوان حداقل غلظت کشندگی بیوفیلم میکروبی (MBBC) در نظر گرفته شد (Schillaci et al., 2005; Schillaci et al., 2008; Das and Dash, 2014).

ارزیابی اثر بازدارندگی بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های باکتریایی به روش MTT

مشابه روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله، رقت‌های سریالی فاز آلی به همراه محیط کشت مایع حاوی باکتری در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه تلقیح و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، محتویات چاهک‌ها با PBS استریل شستشو داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی به همراه ۵ میکرولیتر محلول زرد رنگ ماده متیل‌تيازوتترازولیموم (Methylthiazol Tetrazolium: MTT) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. بعد از آن به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

ارزیابی فعالیت همولیتیک

برای ارزیابی فعالیت همولیتیک (Haemolytic Activity Assay)، فاز آلی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در سرم فیزیولوژی استریل و کشت ۲۴ ساعته باکتری با تراکم 10^6 CFU/mL تهیه شد. در این روش از محیط کشت بلاد آگار (Blood Agar) حاوی خون گوسفندی استفاده شد. با استفاده از سر پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی در محیط کشت ایجاد شد و به آن مقدار ۵۰ میکرولیتر از فاز آلی محلول، باکتری و مخلوط فاز آلی و باکتری تزریق شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد و در نهایت مورد بررسی قرار گرفت و شعاع هاله ایجاد شده، اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تعیین همگنی داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها به کمک آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One way-ANOVA) و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) انجام شد.

نتایج

تعیین مقدار پروتئین

مقدار پروتئین برای سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی به دست آمده از توتیای دریایی نقبزن (*Echinometra mathaei*) به ترتیب با میانگین $61/02$ ، $26/16$ و $74/08$ درصد محاسبه شد که فاز آلی یا استونیتریلی از بیشترین محتوای پروتئینی برخوردار بود و فاز آبی کمترین مقدار پروتئین را داشت ($P < 0.05$).

نتایج آزمایش میکروبی بر روی عصاره‌های

سلومی استخراج شده از توتیا

آزمایش انتشار از دیسک در محیط آگار

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی یا استونیتریلی که هر کدام در غلظت مشخص تهیه شده بودند، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، حاکی از آن بود که فاز آلی بیشترین قطر هاله عدم رشد و فاز آبی کمترین قطر هاله را داشت (جدول ۱). میانگین قطر هاله در هر غلظت برای باکتری *V. parahaemolyticus* در مقایسه با باکتری *L. monocytogenes* بیشتر بود. همچنین، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاز آلی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک تجاری کلرامفنیکل

غلظت ۳۰ میکروگرم در هر دیسک) از قدرت مهارکنندگی بیشتری برخوردار بود. با توجه به این که قطر هاله ضعیفی برای فاز آبی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تشکیل شده بود، مجدد غلظت‌های بالاتر تا ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مورد ارزیابی قرار گرفت و اگرچه کمی قوی‌تر بود ولی تاثیر معناداری بر بازدارندگی رشد باکتری‌ها نداشت ($P > 0.05$; شکل ۱۱).

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی با روش رقیق کردن در محیط مایع

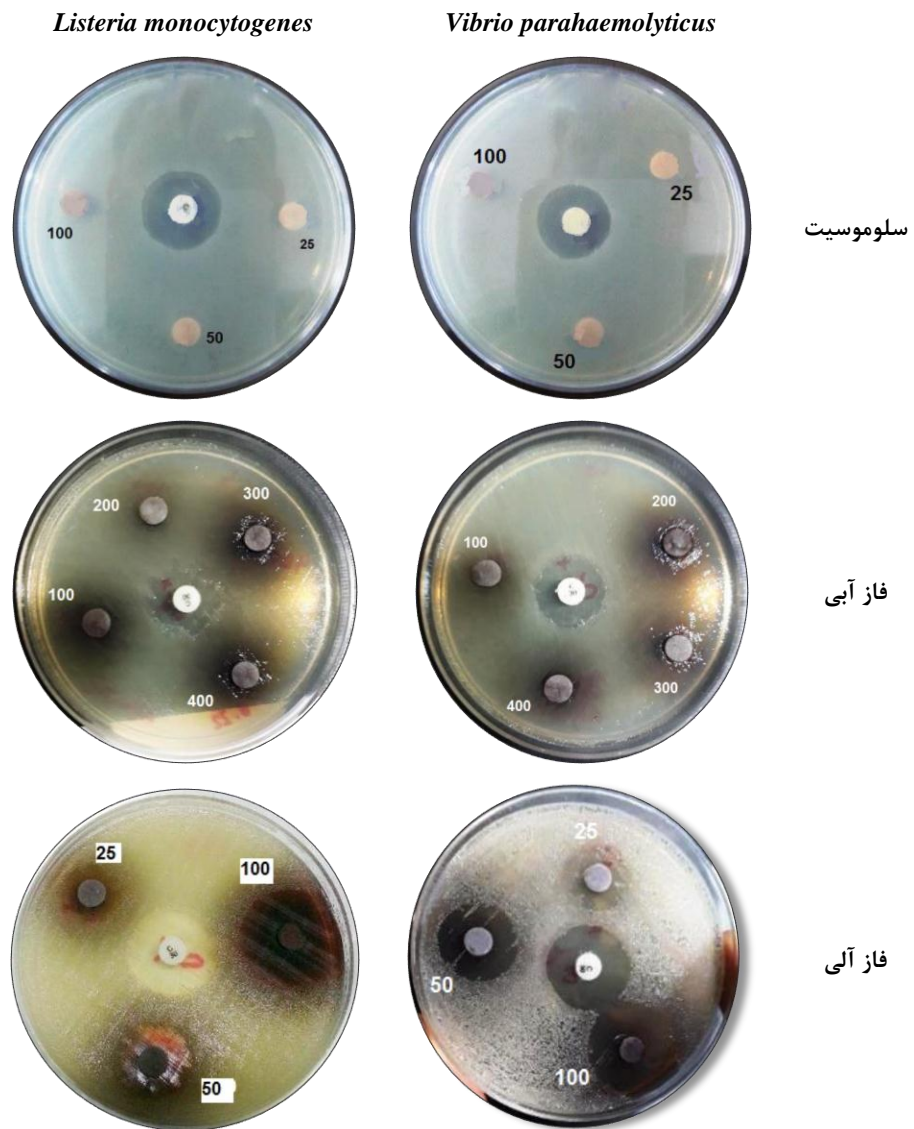
آزمایش انتشار از حفره در محیط آگار
 نتایج آزمایش انتشار از حفره در آگار مربوط به سه نمونه در جدول ۲ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ماده، بر میزان بازدارندگی رشد

با توجه به این که فاز استونیتریلی یا آلی از قوی‌ترین خاصیت ضد میکروبی برخوردار بود، در رقت سریالی یک‌دوم تهیه شده از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که پس از انکوباسیون،

جدول ۱: نتایج آزمایش انتشار از دیسک در آگار برای عصاره سلومی توتیای دریایی نقب‌زن (میانگین \pm انحراف معیار)

باکتری	دیسک	قطر هاله عدم رشد (mm)		
		غلظت ۲۵mg/mL	غلظت ۵۰mg/mL	غلظت ۱۰۰mg/mL
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	سلوموسیت	-	-	۸ \pm ۲
	فاز آبی	-	-	۷ \pm ۲
	فاز آلی	۱۵ \pm ۱	۱۸ \pm ۱	۲۳ \pm ۲
<i>Listeria monocytogenes</i>	سلوموسیت	-	-	۷ \pm ۲
	فاز آبی	-	-	۷ \pm ۱
	فاز آلی	۱۳ \pm ۱	۱۷ \pm ۲	۲۰ \pm ۳

علامت «-» نشان‌دهنده عدم تشکیل هاله در اطراف دیسک است.



شکل ۱: نتایج آزمایش انتشار از دیسک در آگار برای مایع سلومی توتیای دریایی نقبزن

جدول ۲: نتایج آزمایش انتشار از حفره در آگار برای عصاره سلومی توتیای دریایی نقبزن (میانگین \pm انحراف معیار)

کلرامفنیکل ($30\mu\text{g}$)	قطر هاله عدم رشد (mm)			دیسک	باکتری
	غلظت 100mg/mL	غلظت 50mg/mL	غلظت 25mg/mL		
20 \pm 2	14 \pm 2	10 \pm 2	8 \pm 2	سلوموسیت	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
19 \pm 3	8 \pm 2	-	-	فاز آبی	
20 \pm 2	25 \pm 2	21 \pm 2	16 \pm 2	فاز آلی	
18 \pm 2	12 \pm 2	9 \pm 2	7 \pm 2	سلوموسیت	<i>Listeria monocytogenes</i>
18 \pm 2	7 \pm 2	-	-	فاز آبی	
20 \pm 2	22 \pm 2	18 \pm 2	15 \pm 2	فاز آلی	

علامت «-» نشان دهنده عدم تشکیل هاله در اطراف چاهک است.

کدورت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. در غلظت *L. monocytogenes* پس از ۲۴ ساعت قادر به تشکیل بیوفیلم بود. در حالی که باکتری گرم منفی *V. parahaemolyticus* این توانایی را در این بازه زمانی نداشت ولی پس از ۴۸ ساعت بیوفیلم تشکیل داد (شکل ۲).

ارزیابی اثر بازدارندگی فاز آلی بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های باکتری به روش کریستال ویوله

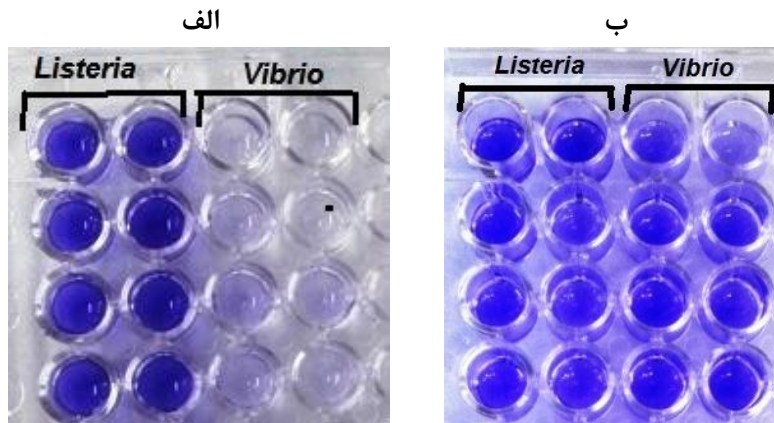
نتایج بررسی وضعیت بیوفیلم‌های باکتریایی که در معرض فاز آلی یا استونیتریلی قرار گرفته بودند نشان داد که این ماده از غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مهار کامل بیوفیلم باکتری‌ها شد و در غلظت ۶/۲۵ حدود ۵۰ درصد

کدورت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. در غلظت ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای هر دو نوع باکتری فاقد کدورت بود و پس از کشت، محتوای چاهک‌های مربوط به این غلظت و غلظت‌های بالاتر نشان داد که غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث کشندگی کل باکتری‌ها شد و کلونی مشاهده نشد.

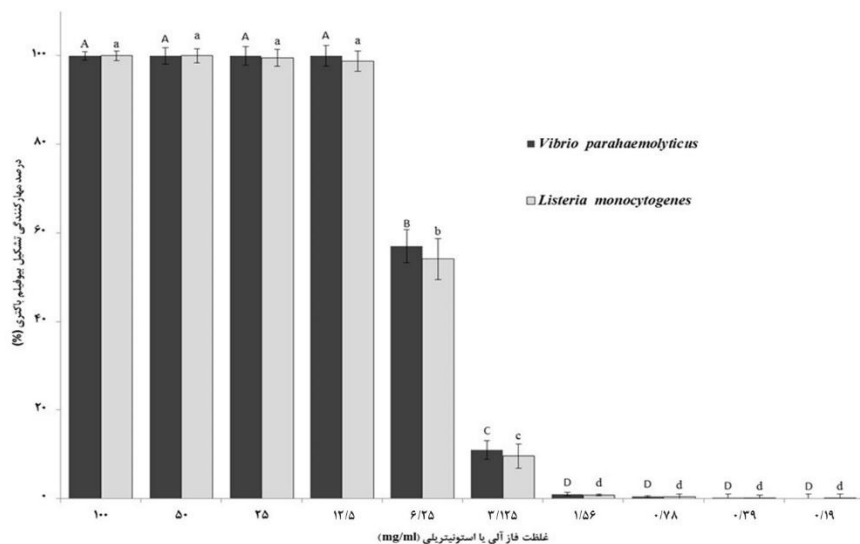
ارزیابی تشکیل بیوفیلم دو سویه باکتری مورد آزمایش به روش کریستال ویوله

نتایج ارزیابی تشکیل بیوفیلم باکتری‌های خالص پس از رنگ‌آمیزی با محلول کریستال ویوله نشان داد که باکتری

آن مهار شد. این روند تا غلظت ۳/۱۲۵ درصد به ادامه فاقد توان در کنترل رشد بیوفیلیم بود طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.05$) و در (شکل ۳).



شکل ۲: نتایج ارزیابی تشکیل بیوفیلیم به روش کریستال ویوله. الف) وضعیت تشکیل بیوفیلیم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون. ب) وضعیت تشکیل بیوفیلیم پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.



شکل ۳: درصد مهارکنندگی بیوفیلیم میکروبی به وسیله فاز آلی توتیای دریایی نقبزن به روش کریستال ویوله (میانگین \pm انحراف معیار). حروف انگلیسی متفاوت، بیانگر وجود اختلاف معنی دار هستند. حروف

بزرگ برای مقایسه اثر غلظت‌های مختلف فاز آلی بر بیوفیلم باکتری *Vibrio parahaemolyticus* و حروف کوچک برای مقایسه اثر غلظت‌های مختلف فاز آلی بر بیوفیلم باکتری *Listeria monocytogenes* هستند.

غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدود ۵۰ درصد تخریب ایجاد کرد. ولی در غلظت‌های بیشتر اثرگذاری آن به مراتب افزایش یافت و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توانست به طور کامل بیوفیلم را تخریب کند (شکل ۵). اگرچه اثر آن بر روی باکتری *V. parahaemolyticus* بیشتر بود ولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

ارزیابی اثر تخریبی فاز آلی بر بیوفیلم میکروبی تشکیل شده به روش فلورسانس

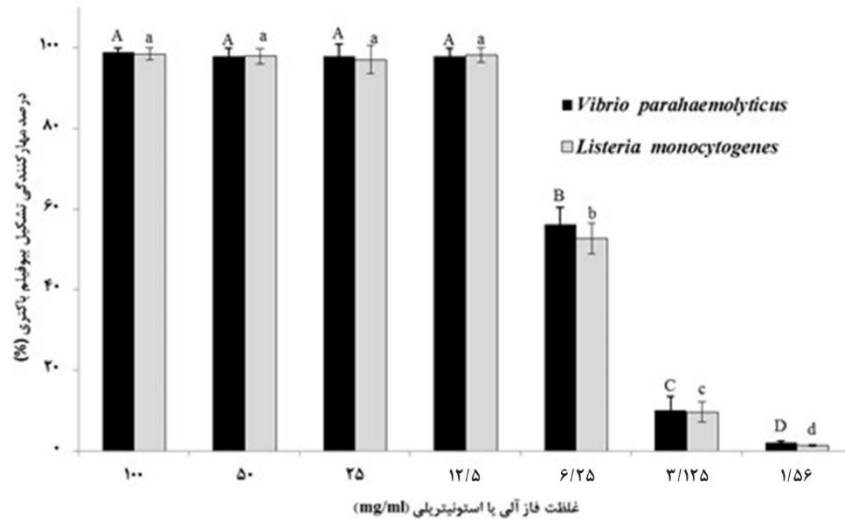
غلظت‌های ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کم‌تر توانایی تخریب بیوفیلم در دو گونه باکتری را نداشتند و میکروپلیت به طور کامل توسط بیوفیلم باکتری‌ها پوشانده شد ولی غلظت‌های بیشتر بر بیوفیلم اثرگذار بود. غلظت‌های ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاز آلی نشان داد که بخش اعظم بیوفیلم ایجاد شده، تخریب شد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور کامل بیوفیلم‌های باکتری‌ها را تخریب کرد (شکل ۶).

ارزیابی اثر بازدارندگی فاز آلی بر تشکیل بیوفیلم سوبیه‌های باکتری به روش MTT

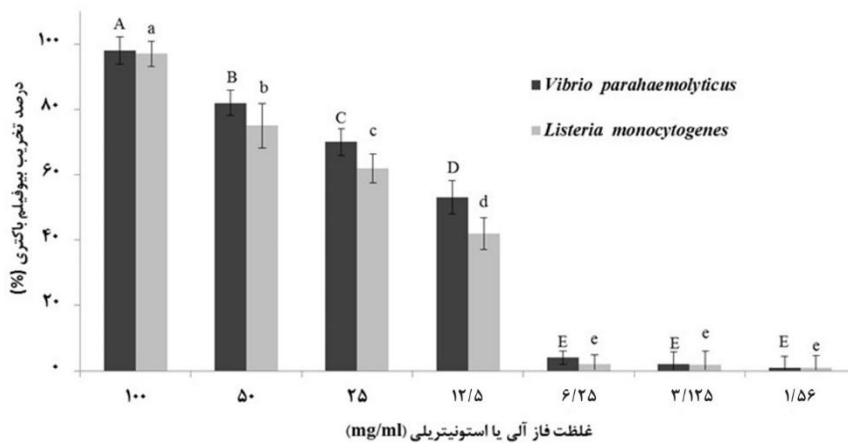
تاثیر فاز آلی یا استونیتریلی بر زنده‌مانی و مهار تشکیل بیوفیلم نشان داد که از رقت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به بالاتر باعث حذف و نابودی باکتری‌ها و در نتیجه بازدارندگی تولید بیوفیلم در این دو باکتری شد و در غلظت ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدود ۵۰ درصد آن‌ها را کنترل کرد که با کاهش غلظت ماده، این قابلیت به حدود صفر رسید (شکل ۴).

ارزیابی اثر تخریبی فاز آلی بر بیوفیلم میکروبی تشکیل شده به روش کریستال ویوله

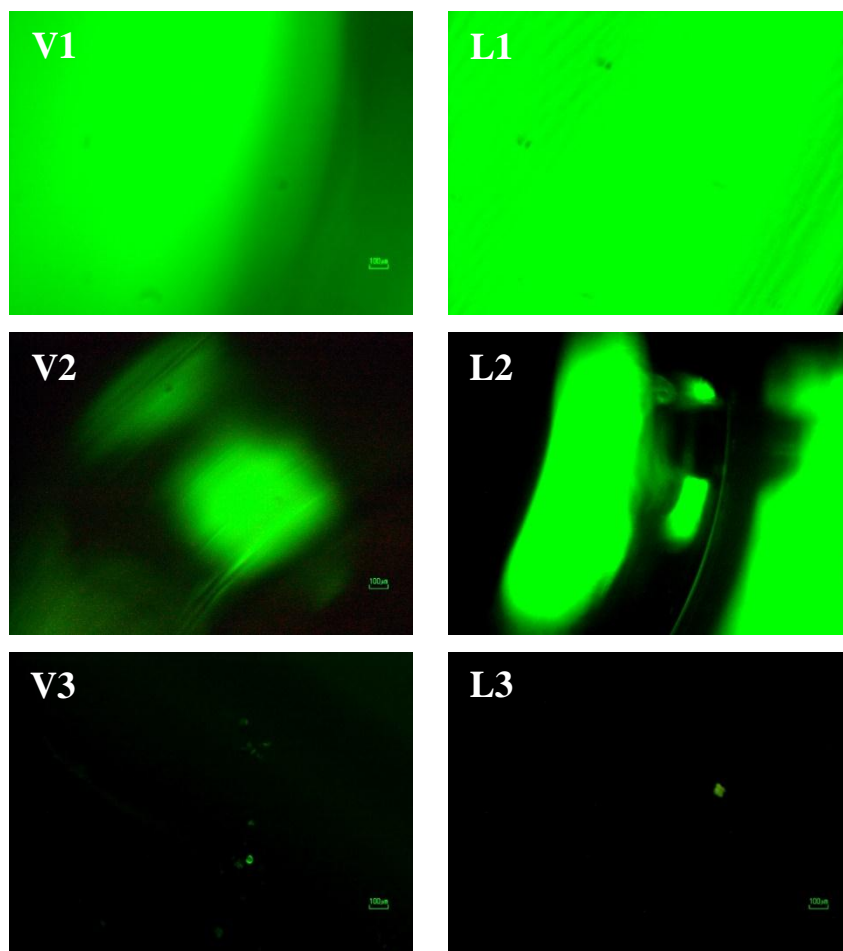
باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در میکروپلیت ۹۶ خانه در شرایط ساکن کشت شدند و سپس فاز آلی یا استونیتریلی در رقت‌های سریالی به آن اضافه شد که نتایج پس از تیمار یک روزه و پس از آن رنگ‌آمیزی با محلول کریستال ویوله نشان داد که فاز آلی اثر قوی‌تری بر تخریب بیوفیلم باکتری *V. parahaemolyticus* در مقایسه با *L. monocytogenes* داشت. در



شکل ۴: درصد مهارکنندگی بیوفیلیم میکروبی به وسیله فاز آلی توتیای دریایی نقبزن به روش MTT (میانگین \pm انحراف معیار). حروف انگلیسی متفاوت، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار هستند. حروف بزرگ برای مقایسه اثر غلظت‌های مختلف فاز آلی بر بیوفیلیم باکتری *Vibrio parahaemolyticus* و حروف کوچک برای مقایسه اثر غلظت‌های مختلف فاز آلی بر بیوفیلیم باکتری *Listeria monocytogenes* هستند.



شکل ۵: درصد تخریب بیوفیلیم میکروبی به وسیله فاز آلی توتیای دریایی نقبزن به روش کریستال ویوله (میانگین \pm انحراف معیار). حروف انگلیسی متفاوت، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار هستند. حروف بزرگ برای مقایسه اثر غلظت‌های مختلف فاز آلی بر بیوفیلیم باکتری *Vibrio parahaemolyticus* و حروف کوچک برای مقایسه اثر غلظت‌های مختلف فاز آلی بر بیوفیلیم باکتری *Listeria monocytogenes* هستند.



شکل ۶: عکس فلورسانس مربوط به تخریب بیوفیلم میکروبی دو سویه باکتری به وسیله فاز آلی توتیای دریایی نقب‌زن. حرف V بیانگر تیمار حاوی باکتری *Vibrio parahaemolyticus* و حرف L بیانگر تیمار حاوی باکتری *Listeria monocytogenes* است. L1 و V1: تیمار فاقد ماده آلی؛ L2 و V2: تیمار حاوی غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاز آلی؛ L3 و V3: تیمار حاوی غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاز آلی.

نتایج ارزیابی فعالیت همولیتیک

با توجه به این که فاز آلی از بیشترین میزان خاصیت ضد میکروبی برخوردار بود به همین جهت فعالیت همولیتیک آن مورد ارزیابی قرار گرفت. فاز آلی با بیشترین غلظت (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) به تنهایی و پس از دوره انکوباسیون تغییری ایجاد نکرد، اما هرکدام از باکتری‌ها باعث همولیز خون شدند. در صورتی که با افزودن فاز آلی به باکتری، قطر هاله کاهش یافت و منجر به کاهش همولیز گلوبول‌های قرمز شد (جدول ۳).

بحث

خارپوستان دریایی همچون بی‌مهرگان دیگر از سیستم ایمنی غیراختصاصی برخوردار هستند (Smith and Davidson, 1992). اما طی پژوهش‌های صورت گرفته، مشخص شد که

جدول ۳: قطر هاله ایجاد شده توسط فاز آلی مایع سلومی توتیای دریایی نقبزن، باکتری‌ها و مخلوط فاز آلی و باکتری (میانگین \pm انحراف معیار)

باکتری	قطر هاله ایجاد شده (میلی متر)		
	فاز آلی	باکتری	باکتری و فاز آلی
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	۱۴±۰/۴ ^a	۸±۰/۱ ^b
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	۱۴±۰/۷ ^a	۸±۰/۴ ^b

آلی و به دنبال آن افزایش میزان پروتئین، بر خاصیت ضدباکتریایی آن افزوده شد که در مورد فاز آبی این موضوع صادق نبود و با وجود افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تغییر محسوس و معناداری بر افزایش اثرگذاری آن بر باکتری‌ها نداشت. در روش انتشار از حفره یا چاهک، این اختلاف مشهودتر و واضح‌تر بود، به نحوی که به ترتیب فاز آلی، سلوموسیت و فاز آبی خاصیت ضد میکروبی داشتند و مشابه روش انتشار از دیسک با افزایش غلظت و در نتیجه افزایش محتوای پروتئینی، بر خاصیت ضد میکروبی آن افزوده شد. مطالعه انجام گرفته بر روی فرکشن‌های مختلف استخراج شده از پوسته و سلوموسیت توتیای سبز *S. droebachiensis* نشان داد که افزایش پروتئین بر خاصیت ضد میکروبی آن به ویژه بر روی باکتری *Vibrio anguillarum* اثر مستقیم داشته است (Haug et al., 2002b).

سلوموسیت‌ها در کل از چهار نوع سلول شامل فاگوسیت‌ها، سلول‌های لرزان (Vibratile Cells)، سلول‌های بی‌رنگ (Colorless Cells) و سلول‌های کروی قرمز رنگ (Red Spherule Cells) تشکیل شده‌اند که بخش اعظم آن را فاگوسیت‌ها تشکیل می‌دهند (Smith et al., 2010). فاگوسیت‌ها

با توجه به این که شرایط رشد میکروب‌ها در محیط زندگی توتیاهای دریایی مساعد است به همین خاطر این موجودات باید از سیستم ایمنی قوی برخوردار باشند تا بتوانند در این محیط‌ها دوام بیاورند و دو بخش مهم بدن یعنی سطح بدن و داخل بدن باید مقاوم باشند (Smith, 2005). به همین علت، این جانوران به عنوان منبع مناسبی برای شناسایی ترکیبات ضد میکروب از جمله پپتیدهای ضد میکروبی به‌ویژه در تامین دارو و نگهدارنده‌های مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Solstad et al., 2016).

در این پژوهش، پس از اندازه‌گیری محتوای پروتئین سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی، خاصیت ضد میکروبی این سه بخش با روش انتشار از دیسک و حفره مورد مقایسه قرار گرفت و مشخص شد که فاز آلی با بیشترین محتوای پروتئینی از بیشترین توان ضد میکروبی برخوردار بود و با کاهش میزان پروتئین به ترتیب در سلوموسیت و فاز آبی، خاصیت ضدباکتریایی نیز کاهش یافت. در روش انتشار از دیسک، فاز آلی با اختلاف معنادار در مقایسه با آن دو، تاثیر ضدباکتری بارزتری نشان داد. ولی سلوموسیت و فاز آبی اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند. همچنین با افزایش غلظت فاز

خارپوستان صید شده (حداکثر ۱۰۰ نمونه) در مطالعات انجام گرفته دیگر، پس از جداسازی فازهای آبی و آلی با استفاده از حلال استونیتریل، مقدار فاز آلی به دست آمده خیلی کم بود و عنوان شد که به دلیل مقدار ناچیز و حلالیت کم آن در آب مقطر، از بررسی آن خودداری شده است. از این رو، این مطالعات بیشتر بر روی فاز آبی متمرکز شده‌اند، به این صورت که با استفاده از فیلترهای سرنگی مخصوص، فرکشن‌های مختلف را استخراج کرده، بعد با یکدیگر مقایسه کرده‌اند که منتج به استخراج و شناسایی پپتیدهای ضد میکروبی با این روش استخراج شده است. ولی در مطالعه حاضر مقدار بیشتری نمونه توتیای زنده (حدود ۷۰۰ عدد) تهیه شد که باعث شد مقدار فاز آلی به دست آمده نیز به نسبت افزایش یابد و مشخص شد که اگرچه فاز آبی به سرعت در آب مقطر حل شد، ولی فاز آلی نیز با هم‌زدن و در مدت زمان بیشتر حل شد. رنگدانه اکینوکروم-A به تنهایی در آب نامحلول بود و خاصیت ضد میکروبی ناچیزی نداشت. اما با افزودن آب دریای حاوی پروتئین پستانداران بر میزان حلالیت آن افزوده شد و فعالیت باکتری‌کشی در برابر هر دو نوع باکتری‌های گرم مثبت و منفی داشت. این رنگدانه به عنوان عامل موثر در

نقش اصلی را در ایمنی دارند (Gerardi et al., 1990; Gross et al., 2000). سلول‌های لرزان مسئول لخته شدن، حرکت و تحریک مایع سلومی هستند (Bertheussen and Seljelid, 1978)، سلول‌های کروی قرمز حاوی رنگدانه‌های نفتاکینونی به نام اکینوکروم A هستند که خاصیت ضدباکتریایی دارند (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۴ج) و سلول‌های کروی بی‌رنگ با خواص ایمنی نامشخص هستند. فاگوسیت‌ها و سلول‌های کروی قرمز رنگ، فعالیت ضدباکتری قوی‌تری به ویژه بر روی باکتری‌های گرم منفی دارند (Gerardi et al., 1990). اما مطالعات بعدی نشان داد که هر چهار نوع سلول در تولید انواع مختلف پپتیدهای ضد میکروبی نقش دارند (Li et al., 2014). مایع سلومی پس از تخلیه شدن به رنگ قرمز کم‌رنگ یا صورتی بود که پس از سانتریفوژ، سلول‌های سلوموسیت رسوب کردند و رنگ مایع رویی آن شفاف‌تر شد. علت رنگی بودن سلوموسیت‌ها وجود رنگدانه اکینوکروم-A موجود در سلول‌های کروی قرمز رنگ است (Coates et al., 2018). پس از استخراج و جداسازی دو فاز توسط حلال استونیتریل، فاز آبی کم‌رنگ‌تر و فاز آلی یا استونیتریلی پررنگ‌تر بود. به دلیل تعداد محدود نمونه توتیا و دیگر

بررسی وضعیت زنده‌مانی باکتری‌ها با ماده MTT نیز نشان داد که این غلظت باعث نابودی کامل باکتری‌ها شد و حتی به صورت پلانکتونی و یا شناور نیز دیده نشدند. پژوهشی که بر روی توتیای *Paracentrotus lividus* انجام گرفت نشان داد که فرکشن پپتیدی ۵ کیلودالتونی تهیه شده از سلوموسیت باعث ممانعت از تشکیل بیوفیلم باکتریایی می‌شود (Schillaci et al., 2010). همچنین تاثیر ضدبیوفیلم باکتریایی پپتید ضد میکروبی Paracentrin 1 که از سلوموسیت همین گونه استخراج شد بیانگر آن است که در دامنه پروتئینی خاص، باعث عدم تشکیل بیوفیلم می‌شود (Schillaci et al., 2014). همچنین در خارپوستان دیگر مانند *Holothuria tubulosa* نیز این ویژگی گزارش شده است (Schillaci et al., 2013).

اثر تخریبی فاز آلی بر بیوفیلم تشکیل شده نیز نشان داد که از غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیش از نیمی از بیوفیلم ایجاد شده در مقایسه با تیمار بدون ماده، تخریب شد که با افزایش غلظت آن روند افزایشی به خود گرفت و تنها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور کامل باعث تخریب و حذف بیوفیلم باکتری‌ها شد. نتایج بررسی زنده‌مانی باکتری‌ها

فعالیت‌های ضدباکتریایی در بدن این موجودات شناخته شده است (Service and Wardlaw, 1984). به علاوه، بررسی انجام شده بر روی توتیاهای جنس *Strongylocentrotus* نشان داد که این رنگدانه با پروتئین‌های سلوموسیت پیوند برقرار می‌کند و باعث فعالیت ضدباکتریایی می‌شود (Johnson, 1970).

توالی‌یابی ژنوم کامل توتیای *Strongylocentrotus purpuratus* منجر به شناسایی تنوع بسیار زیاد و شگفت‌انگیزی از مولکول‌های ایمنی در این موجود شد (Hibino et al., 2006; Rast et al., 2006) که با ادامه پژوهش‌ها بر روی گونه‌های دیگر توتیا، منجر به شناسایی پپتیدهای ضد میکروبی متعددی شد (Schillaci et al., 2005; Schillaci et al., 2012; Li et al., 2015).

با توجه به این که فاز آلی از بیشترین خاصیت ضدباکتریایی برخوردار بود، در ادامه کار، توانمندی این فاز بر بازدارندگی و تخریب بیوفیلم باکتری نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج روش‌های مختلف نشان داد که در غلظت ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدود ۵۰ درصد از تشکیل بیوفیلم باکتریایی ممانعت به عمل آورد و از غلظت ۱۲/۵ به بالاتر، جلوی رشد و تکثیر جمعیت باکتریایی به طور کامل گرفته شد.

با استفاده از ماده فلورسانس SYTO9 سبز رنگ نیز بیانگر همین موضوع بود. با توجه به تاثیر مناسب فاز آلی بر باکتری‌ها، به نظر می‌رسد که این ماده می‌تواند در فرمولاسیون دارو مورد استفاده قرار گیرد، اما میزان سمی بودن هر ماده‌ای قبل از استفاده باید مد نظر قرار گیرد که آزمون همولیتیک یکی از این روش‌ها است (Paulsen et al., 2013). به

همین منظور تاثیر فاز آلی بر همولیز سلول‌های یوکاریوتی (خون گوسفند) مورد ارزیابی قرار گرفت و آزمایش نشان داد که فاز آلی بر گلبول‌های قرمز بی‌تاثیر بود و با وجود همولیز ایجاد شده توسط باکتری‌ها، مخلوط آن با باکتری باعث کاهش همولیز سلولی شد و در واقع فاز آلی تا حدی مانع از همولیز گلبول‌ها توسط باکتری شد. عوامل مختلفی در ایجاد فعالیت همولیتیک از خارپوستان گزارش شده است که شامل پروتئین‌ها (Canicatti and D'Ancona, 1990)، لکتین‌ها (Hatakeyama et al., 1994)، فاکتورهای شبه کامپلمان (Bertheussen, 1983) و ساپونین‌ها (Iorizzi et al., 2001) هستند. مقایسه فعالیت همولیتیک اجزای مختلف بدن از جمله سلوموسیت‌ها در سه گونه خارپوست دریایی شامل توتیای دریایی سبز

Strongylocentrotus droebachiensis و *Cucumaria frondosa* و ستاره دریایی *Asterias rubens* نشان داد که به طور کلی، بخش‌های مختلف بدن فعالیت همولیتیک دارد ولی در توتیای دریایی محدودتر و کمتر است که علت آن را به وجود میزان کمتر ساپونین‌ها در مقایسه با دو گونه دیگر نسبت داده‌اند (Haug et al., 2002a).

مطالعه حاضر نشان داد که سلوموسیت توتیای دریایی نقبزن به ویژه فاز آلی از خاصیت ضدباکتریایی مناسبی برخوردار بود و علاوه بر مهار بیوفیلیم میکروبی توانایی تخریب نیز داشت و ماهیت پروتئینی آن واضح بود که رنگدانه به همراه پروتئین‌های مرتبط با آن می‌تواند در افزایش قدرت ضدباکتریایی نقش بارزی داشته باشد. از این رو، به نظر می‌رسد که با خالص‌سازی بیشتر عصاره سلومی، جداسازی ترکیبات زیست‌فعال و شناسایی ماهیت شیمیایی آن‌ها، می‌توان به منظور استفاده در صنایع دارویی مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- اصلیان ح.، کامرانی ا.، یوسفزادی م. و کشاورز م. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *Echinometra mathaei* مجله بوم‌شناسی آبزیان. (۳)۵: ۱۳۹-۱۴۴.
- ایراجیان غ.، برومند م.، مرنندی ف.ر.، رهبر م.، شاهچراغی ف.، شریفی م.، صارمی م.، فلاح ف. و ولی‌زاده ب. ۱۳۹۱. استاندارد عملکردی آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار از دیسک. مرکز نشر صدا. ۱۶۴ص.
- خالقی م. و عوفی ف. ۱۳۸۹. شناسایی گونه‌های خارپوستان دریایی در نواحی بین جزر و مدی خلیج چابهار. محیط زیست جانوری، (۴)۲: ۳۱-۳۶.
- راهی س.، حیدری ب. و رسا م. ۱۳۹۳. اثرات عصاره‌های آلی و آبی استخراج شده از توتیای دریایی خلیج فارس (*Echinometra mathaei*) بر سه سویه بیماری‌زای قارچ *Candida*. نشریه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، (۳)۲: ۳۱-۴۵.
- راهی س.، حیدری ب. و رسا م. ۱۳۹۶. اثرات ضدباکتریایی بخش‌های مختلف توتیای دریایی خلیج فارس. نشریه توسعه آبی‌پروری، (۳)۱۱: ۲۹-۴۰.
- سلیمانی س.، معین س.، یوسفزادی م. و امراللهی بیوکی ن. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف استخراجی از اندام‌های توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) بر فعالیت آنزیم آلفا‌امیلاز. مجله دیابت و متابولیسم ایران، (۲)۱۵: ۷۵-۸۳.
- سلیمانی س.، یوسفزادی م.، معین س. و امراللهی بیوکی ن. ۱۳۹۴. الف. بررسی اثر ضدالتهابی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* خلیج فارس. طب جنوب، (۶)۱۸: ۱۲۲۰-۱۲۰۸.
- سلیمانی س.، یوسفزادی م.، معین س. و امراللهی بیوکی ن. ۱۳۹۴. ج. بررسی اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی رنگدانه و مایع سلومیک توتیای دریایی گونه *Echinometra mathaei* خلیج فارس. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، (۶)۲۲: ۶۲۸-۶۱۴.
- سلیمانی س.، یوسفزادی م.، معین س. و امراللهی بیوکی ن. ۱۳۹۵. انتخاب روش بهینه استخراج مایع سلومیک توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) خلیج فارس و شناسایی برخی رنگدانه‌های نفتاکینونی آن. مجله پژوهش‌های جانوری، (۲)۲۹: ۲۱۴-۲۰۵.
- شکوری آ. و جوانمرد ا.ا. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدباکتریایی پوسته توتیای دریایی گونه *Echinometra mathaei* ساحل چابهار. مجله زیست‌شناسی جانوری تجربی، (۴)۳: ۲۵-۳۵.
- شکوری آ.، جوانمرد ا.ا. و سهیلی ف. ۱۳۹۴. اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف استخراجی از اندام‌های توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*)

- نوربخش ه. و عمادی ح. ۱۳۸۷. توتیای دریایی از زیست‌شناسی تا تکثیر و پرورش. انتشارات علمی آبزیان. ۱۶۶ ص.
- APD Database. 2019.** Antimicrobial Peptide Database. Retrieved August 03, 2019, from <http://aps.unmc.edu/AP/>.
- Balouri M., Sadiki M. and Ibsouda S.K. 2016.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71–79.
- Bertheussen K. 1981.** Endocytosis by echinoid phagocytes in vitro. II. Mechanisms of endocytosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 5(4): 557–564.
- Bertheussen K. 1983.** Complete-like activity in sea urchin coelomic fluid. *Developmental and Comparative Immunology*, 7: 21–31.
- Bertheussen K. and Seljelid R. 1978.** Echinoid phagocytes in vitro. *Experimental Cell Research*, 111: 401–412.
- Boto A., Perez De La Lastra J. and Gonzalez C. 2018.** The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs. *Molecules*, 23(2): 311 (1–26).
- Canicatti C. and D’Ancona G. 1990.** Biological protective substances in *Marthasterias glacialis* (Asteroidea) epidermal secretion. *Journal of Zoology*, 222(3): 445–454.
- Chiaramonte M. and Russo R. 2015.** The echinoderm innate humoral immune response. *Italian Journal of Zoology*, 82(3): 300–308.
- Chopra L., Singh G., Kumar Jena K. and Sahoo D.K. 2015.** Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific Reports*, 5: 1–?? (13412).
- CLSI. 2012.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 92P.
- Coates C.J., McCulloch C., Betts J. and Whalley T. 2018.** Echinochrome-A release by red spherule cells is an iron-withholding strategy of sea urchin innate immunity. *Journal of Innate Immunity*, 10(2): 119–130.
- Coffaro K.A. and Hinegardner R.T. 1977.** Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science*, 197(4311): 1389–1390.
- Das S. and Dash H. 2014.** Microbial Biotechnology- A Laboratory

- Manual for Bacterial Systems. Springer, India. 239P.
- Gerardi P., Lassegues M. and Canicatti C. 1990.** Cellular distribution of sea urchin antibacterial activity. *Biology of the Cell*, 70(3): 153–157.
- Gomes B., Augusto M.T., Felicio M.R., Hollmann A., Franco O.L., Goncalves S. and Santos N.C. 2018.** Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. *Biotechnology Advances*, 36(2): 415–429.
- Gross P.S., Clow L.A. and Smith L.C. 2000.** SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. *Immunogenetics*, 51(12): 1034–1044.
- Hatakeyama T., Kohzaki H., Nagatomo H. and Yamasaki N. 1994.** Purification and characterization of four Ca²⁺-dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. *The Journal of Biochemistry*, 116(1): 209–214.
- Haug T., Kjuul A.K., Stensvag K., Sandsdalen E. and Styrvold O.B. 2002b.** Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish and Shellfish Immunology*, 12(5): 371–385.
- Haug T., Kjuul A.K., Styrvold O.B., Sandsdalen E., Olsen O.M. and Stensvag K. 2002a.** Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(2): 94–102.
- Hibino T., Loza-Coll M., Messier C., Majeske A.J., Cohen A.H., Terwilliger D.P., Buckley K.M., Brockton V., Nair S.V., Berney K., Fugmann S.D., Anderson M.K., Pancer Z., Cameron R.A., Smith L.C. and Rast J.P. 2006.** The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Developmental Biology*, 300(1): 349–365.
- Iorizzi M., Marino S. and Zollo F. 2001.** Steroidal oligoglycosides from the Asteroidea. *Current Organic Chemistry*, 5(9): 951–973.
- Johnson P.T. 1970.** The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus* and *Centrostephanus*)-VI. Cellulose-acetate membrane electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 37(3): 289–300.
- Kazemi S., Heidari B. and Rassa M. 2016.** Antibacterial and hemolytic effects of aqueous and organic extracts from different tissues of sea urchin *Echinometra mathaei* on pathogenic streptococci.

- International Aquatic Research, 8(4): 299–308.
- Krapp F., Ozer E.A., Qi C. and Hauser A.R. 2018.** Case report of an extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection with genomic characterization of the strain and review of similar cases in the United States. Open Forum Infectious Diseases, 5(5): 1–5.
- Kumar D., Pornsukarom S. and Thakur S. 2019.** Antibiotic usage in poultry production and antimicrobial-resistant *Salmonella* in poultry. P: 47–66. In: Venkitanarayanan K., Thakur S. and Ricke S. (Eds.). Food Safety in Poultry Meat Production. Food Microbiology and Food Safety. Springer, Switzerland.
- Li C., Blencke H.M., Haug T. and Stensvag K. 2015.** Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. Developmental and Comparative Immunology, 49(1): 190–197.
- Li C., Blencke H.M., Haug T., Jorgensen O. and Stensvag K. 2014.** Expression of antimicrobial peptides in coelomocytes and embryos of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). Developmental and Comparative Immunology, 43(1): 106–113.
- Li C., Blencke H.M., Smith L.C., Karp M.T. and Stensvag K. 2010a.** Two recombinant peptides, SpStrongylocins 1 and 2, from *Strongylocentrotus purpuratus*, show antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Developmental and Comparative Immunology, 34(3): 286–292.
- Li C., Haug T., Moe M.K., Styrvoid O.B. and Stensvag K. 2010b.** Centrocin: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. Developmental and Comparative Immunology, 34(9): 959–968.
- Li C., Haug T., Styrvoid O.B., Jorgensen T.O. and Stensvag K. 2008.** Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. Developmental and Comparative Immunology, 32(12): 1430–1440.
- Liang X., Luo D. and Luesch H. 2019.** Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. Pharmacological Research, 147: 1–41 (104373).
- Paulsen V.S., Blencke H.M., Benincasa M., Haug T., Eksteen J.J., Styrvoid O.B., Scocchi M. and Stensvag K. 2013.** Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin 1- and mode of action studies of the N-

- terminal, proline-rich region. PLoS ONE, 8(1): 1–11 (e53326).
- Plytycz B. and Seljelid R. 1993.** Bacterial clearance by the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. Developmental and Comparative Immunology, 17(3): 283–289.
- Rast J.P., Smith L.C., Loza-Coll M., Hibino T. and Litman G.W. 2006.** Genomic insights into the immune system of the sea urchin. Science, 314(5801): 952–956.
- Schillaci D., Arizza V., Dayton T., Camarda L. and Di Stefano V. 2008.** In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. Letters in Applied Microbiology, 47(5): 433–438.
- Schillaci D., Arizza V., Parrinello N., Di Stefano V., Fanara S., Muccilli V., Cunsolo V., Haagenen J.J.A. and Molin S. 2010.** Antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Journal of Applied Microbiology, 108(1): 17–24.
- Schillaci D., Cusimano M., Cunsolo V., Saletti R., Russo D., Vazzana M., Vitale M. and Arizza V. 2013.** Immune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. AMB Express, 3(1): 1–10 (35).
- Schillaci D., Cusimano M.G., Spinello A., Barone G., Russo D., Vitale M., Parrinello D. and Arizza V. 2014.** Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. AMB Express. 4(78): 1–9.
- Schillaci D., Petruso S. and Sciortino V. 2005.** 3,4,5,3',5'-pentabromo-2-(2'-hydroxybenzoyl) pyrrole: A potential lead compound as anti-gram-positive and anti-biofilm agent. International Journal of Antimicrobial Agents, 25(4): 338–340.
- Schillaci D., Vitale M., Cusimano M.G. and Arizza V. 2012.** Fragments of β -thymosin from the sea urchin *Paracentrotus lividus* as potential antimicrobial peptides against staphylococcal biofilms. Annals of the New York Academy of Sciences, 1270(1): 79–85.
- Service M. and Wardlaw A.C. 1984.** Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). Comparative Biochemistry and Physiology B, 79(2): 161–165.
- Shagghi N., Palombo E.A., Clayton A.H.A. and Bhawe M. 2018.** Antimicrobial peptides: Biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality.

- World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(4): 34–62.
- Smith L.C. 2005.** Host responses to bacteria: Innate immunity in invertebrates. *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*, 10: 293–320.
- Smith L.C. and Davidson E.H. 1992.** The echinoid immune system and the phylogenetic occurrence of immune mechanisms in deuterostomes. *Immunology Today*, 13(9): 356–362.
- Smith L.C., Ghosh J., Buckley K.M., Clow L.A., Dheilly N.M., Haug T., Henson J.H., Li C., Lun C.M., Majeske A.J. and Matranga V. 2010.** Echinoderm immunity. P: 260–301. In: Soderhall K. (Ed.). *Invertebrate Immunity*. Springer US, USA.
- Smith L.C., Rast J.P., Brockton V., Terwilliger D., Nair S.V., Buckley K.M. and Majeske A.J. 2006.** The sea urchin immune system. *Invertebrate Survival Journal*, 3: 25–39.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. and Klenk D.C. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1): 76–85.
- Solstad R.G., Li C., Isaksson J., Johansen J., Svenson J., Stensvag K. and Haug T. 2016.** Novel antimicrobial peptides EeCentrocins 1, 2 and EeStrongylocin 2 from the edible sea urchin *Echinus esculentus* have 6-br-trp post-translational modifications. *PLoS ONE*, 11(3): 1–25.
- Stabili L. and Canicatti C. 1994.** Antibacterial activity of the seminal plasma of *Paracentrotus lividus*. *Canadian Journal of Zoology*, 72(7): 1211–1216.
- Ventola C.L. 2015.** The antibiotic resistance crisis, Part 1: Causes and threats. *A Peer-reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4): 277–283.
- Wang G. 2017.** Antimicrobial peptides: Discovery, design and novel therapeutic strategies. CABI, UK. 261P.
- Wardlaw A.C. and Unkles S.E. 1978.** Bactericidal activity of coelomic fluid from the sea urchin *Echinus esculentus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 32(1): 25–34.
- Yui M.A. and Bayne C.J. 1983.** Echinoderm immunology: Bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *The Biological Bulletin*, 165(2): 473–486.
- Zasloff M. 2002.** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870): 389–395.



Research Paper

Evaluation of antibacterial and antibiofilm activity of phases extracted from coelomic fluid of burrowing urchin (*Echinometra mathaei*)

Majid Moosapour Shajani¹, Seyyed Fakhreddin Hosseini^{2*}, Masoud Rezaei³, Domenico Schillaci⁴

Received: September 2019

Accepted: November 2019

Abstract

Marine echinoderms, including sea urchins, have a high ability to survive due to living in shallow environments that are suitable for growth of microbes. Due to such unique characteristics, much attention has been paid to the purification and identification of a variety of bioactive compounds, especially antimicrobial peptides. Therefore, the present study aimed to investigate the coelomic fluid of the burrowing urchin (*Echinometra mathaei*), as the most abundant species in the Persian Gulf, and to extract the aqueous and organic phases from coelomocyte cells by a particular solvent. The results of the agar disk and well diffusion assays showed that the organic phase had a higher antibacterial activity, which could be attributed to its protein content. The organic phase at a concentration of higher than 12.5mg.mL⁻¹ caused complete inhibition of the bacterial biofilm, while it destroyed the biofilm completely in the concentration of 100mg.ml⁻¹. The organic phase lacked haemolytic activity at the concentration of 100mg.ml⁻¹ and even inhibited the red blood cell haemolysis. Based on the results, it is suggested that the organic phase extracted from the burrowing urchin coelomocyte may be considered for the extraction and identification of antimicrobial compounds.

Key words: *Sea Urchin, Echinometra mathaei, Anti-biofilm Activity, Coelomocyte.*

1- Ph.D. Student in Fisheries-Seafood Processing, Department of Seafood Processing, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Associate Professor in Department of Seafood Processing, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Professor in Department of Seafood Processing, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

4- Associate Professor in Department of Biological, Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo, Palermo, Italy.

*Corresponding Author: hosseinisf@modares.ac.ir