فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال نهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* و خیار دریایی *Holothuria leucospilota*

ناصر عبیاوی[۱]، لاله رومیانی[۲]*

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره خیار دریایی *Holothuria leucospilota* و توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH بود. نمونه‌های توتیا و خیار دریایی از اطراف جزیره قشم جمع‌آوری شدند. فعالیت ضدمیکروبی توتیای دریایی از طریق بررسی قطر هاله عدم رشد و در خیار دریایی از روش رقت لوله‌ای انجام شد. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره انجام شد. نتایج نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هر دو گونه با افزایش غلظت عصاره روند افزایشی داشت ($P<0/05$) و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ۵/۵۷±۳۲۰ و ۶/۹۵±۴۲۰ میلی‌گرم اسید اسکوربیک در گرم عصاره به ترتیب در توتیا و خیار دریایی رسید. در تمامی غلظت‌های مورد بررسی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خیار دریایی بالاتر از توتیای دریایی بود ($P<0/05$). در هر دو گونه، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره با ۵/۱۵±۲۰/۲۱ و ۳/۷۶±۵۶/۱۱ میلی‌گرم اسید اسکوربیک در گرم عصاره، بیشترین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد را داشت و در هر دو گونه مورد بررسی، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در مقایسه با اسید اسکوربیک کمتر بود ($P<0/05$). عصاره هر سه بخش گناد، پوست و خار گونه‌های مورد مطالعه، توانایی مهار باکتری *Staphylococcus aureus* را داشتند. غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره گناد توتیای‌دریایی توانایی مهار همه باکتری‌ها را داشت ولی تفاوت معنی‌دار بین این دو غلظت مشاهده نشد ($P>0/05$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که توتیای دریایی و خیار دریایی می‌توانند حاوی منابعی غنی از ترکیبات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که توتیای دریایی توانست بر باکتری‌های گرم منفی اثر ضدباکتریایی نشان دهد.

واژگان کلیدی: *عصاره، رادیکال آزاد DPPH، باکتری گرم مثبت، باکتری گرم منفی.*

۱- کارشناس ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.
* نویسنده مسئول: l.roomiani@yahoo.com

مقدمه

موجودات دریایی منبع غنی از متابولیت‌ها و ترکیبات زیست‌فعال هستند که فعالیت‌های زیستی و دارویی دارند و این موضوع باعث شده است که مطالعات گسترده‌ای بر روی شناسایی و استخراج این ترکیبات انجام شود. دانشمندان در جستجوی افزایش اطلاعات در زمینه توان بالقوه دارویی و شناسایی متابولیت‌های زیست‌فعال در گونه‌های دریایی هستند (Sottorff et al., 2013; Thakur et al., 2013). در حال حاضر بسیاری از متابولیت‌های شیمیایی منحصر به فرد از محیط‌های دریایی استخراج شده‌اند که در واقع بخش کوچکی از تنوع زیستی و شیمیایی اقیانوس‌ها را تشکیل می‌دهند (Ireland et al., 1993).

خیار دریایی *Holothuria leucospilota* از شاخه خارپوستان، منبع غذایی غنی برای انسان در بسیاری از نقاط آسیا محسوب می‌شود (Taiyeb-Ali et al., 2003). خیار دریایی حاوی گلیکوزیدها (Silchenko et al., 2008) به ویژه تری‌ترپن‌گلیکوزید است که فعالیت ضدمیکروبی و ضدتوموری دارد (Kitagawa et al., 1979). همچنین این موجودات دارای مقادیر زیادی لکتین (Gowda et al., 2008)، سربروزید، گلیکوزآمینوگلایسین (Wu et al., 2010)، استرول و اسیدهای چرب امگا ۳ و امگا ۶ هستند (Jha and Zi-Rong, 2004).

توتیای دریایی *Echinometra mathaei* متعلق به شاخه خارپوستان و از بی‌مهرگان دریایی است (Amarowicz et al., 2012). گونه‌های متنوع توتیاهای دریایی به طور وسیعی در اقیانوس‌های جهان و از منطقه جزر و مدی تا اعماق زیاد اقیانوس‌ها پراکنده شده‌اند (Kuwahara et al., 2009; Smith et al., 2010). توتیاها دارای ترکیبات زیست‌فعال هستند و در مطالعات مختلف ثابت شده است که عصاره توتیای دریایی دارای فعالیت ضدباکتریایی است (Haug et al., 2002; Abubakar et al., 2012). گنادهای توتیای دریایی محتوی مقدار زیادی اسیدهای آمینه آزاد تا حدود ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم پروتئین خام هستند (Amarowicz et al., 1994). همچنین توتیای دریایی دارای رنگدانه‌های پلی‌هیدروکسیلات نفتاکینون (PHNQ) متنوعی از اسپینوکروم‌های شناخته شده هستند (Kuwahara et al., 2010). گروه‌های هیدروکسیل فنولیک در این رنگدانه‌ها و به دنبال آن، رنگدانه‌های هیدروکسیلات نفتاکینون توتیای دریایی، فعالیت زیستی

متعددی را نشان داده‌اند (Kuwahara et al., 2010; Amarowicz et al., 2012).

موجودات دریایی دارای ترکیبات طبیعی با کاربردهای تغذیه‌ای، دارویی و پزشکی است (Jha and Zi-Rong, 2004). از این رو آزمایش‌های بسیاری در زمینه استخراج آزمایشگاهی این مواد و استفاده از آنها به عنوان مواد ضدسرطانی (Roginsky et al., 2004)، ضدانعقادی (Chen et al., 2011)، ضدفساد (Collin, 2004)، ضدمیکروبی (Hing et al., 2007)، آنتی‌اکسیدانی (Althunibat et al., 2009)، ضدالتهابی (Mourao et al., 1998)، ضدتوموری (Zhou et al., 2018) متمرکز شده‌اند. با توجه به این یافته‌ها، مطالعه حاضر با هدف مقایسه ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره پپتیدی توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) و خیار دریایی (*Holothuria leucospilota*) انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* و توتیای دریایی *Echinometra mathaei* در زمستان ۱۳۹۸ از منطقه جزر و مدی جزیره قشم جمع‌آوری و با استفاده از یخ به ساحل منتقل شدند. برای از بین رفتن نمک آب دریا، نمونه‌ها با آب مقطر شستشو و بخش‌های گناد، پوست و خار در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز جداسازی شد. سپس برای خشک شدن و از بین رفتن رطوبت این بخش‌ها، در دستگاه فریز درایر (LDplus seite5، Martin Christ، آلمان) با دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند (Haug et al., 2002).

عصاره‌گیری

عصاره بخش‌های مختلف خیار دریایی و توتیای دریایی، با استفاده از آنزیم دی‌پپتیل پپتیداز ۴ و فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین انجام شد. برای بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، عصاره‌گیری از کل بدن و در باره فعالیت ضدباکتریایی از بخش‌های گناد، پوست و خار به شکل جداگانه انجام شد. قبل از شروع آزمایش، نمونه‌های خرد شده به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها با ۱۰۰ میلی لیتر بافر Tris-HCl ۱ مولار با pH ۸ و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد شسته شدند. این عمل ۵ بار تکرار شد. عصاره به دست آمده به مدت ۳۰

دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Universal، آلمان) شد. بخش بالایی حفظ و ۴۰ میلی‌لیتر از آن به مدت ۲۴ ساعت در ۲ درجه سانتی‌گراد در لوله‌های ۱۰kDa و به همراه محلول ۰/۱ درصد بافر Tris-HCl ۱ مولار با pH ۸ هضم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. عصاره به دست آمده با استفاده از فیلتر Vivaspin 10kDa (این فیلتر با استفاده از نیروی گریز از مرکز، مدت زمان و دما بهینه می‌شود) با ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیلتر شد. عصاره در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (Falkenberg et al., 2014).

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) طبق روش Ganesan و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. به این ترتیب که ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره‌ها با غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد. یک ستون از میکروپلیت به عنوان شاهد با آب، متانول و رادیکال آزاد DPPH پر شد. محلول رادیکال آزاد DPPH با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت. به هر یک از چاهک‌های حاوی عصاره، ۶۳ میکرولیتر رادیکال آزاد DPPH و ۱۸۷ میکرولیتر متانول اضافه شد. پس از اضافه کردن معرف، برای جلوگیری از تاثیر نور بر اثرات آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات معرف، در پلیت بسته و با فویل پوشانده شد. میکروپلیت به مدت ۵۰-۴۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت.

پس از آن، جذب نوری تیمارها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis 1280، Shimadzu، ژاپن) ثبت شد. اسید اسکوربیک به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر جذب بلانک از نمونه‌های متناظر کم شد. سپس میانگین جذب هر غلظت از نمونه و میانگین جذب شاهد در فرمول گذاشته شد و با رسم منحنی غلظت‌های مختلف در برابر اعداد متناظر به دست آمده با محاسبه A_F (جذب نهایی) از رابطه ۱، غلظتی از نمونه که در آن ۵۰ درصد جذب رادیکال‌های آزاد (Inhibition Concentration of IC_{50}%) صورت می‌گیرد، تعیین شد (پیشه‌ورزاد و همکاران، ۱۳۹۳). از این غلظت برای مقایسه نمونه‌ها با یکدیگر استفاده شد. درصد بازدارندگی (In) توسط

نمونه‌ها نیز از رابطه ۲ به دست آمد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۴).

رابطه ۱:

$$A_F\,(\%) = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100$$

A_C: جذب شاهد؛ A_S: جذب نمونه.

رابطه ۲:

$$In\,(\%) = [(A_B - A_S) / A_B] \times 100$$

A_B: جذب شاهد؛ A_S: جذب نمونه.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره بخش‌های مختلف توتیای دریایی

اثرات ضدباکتریایی عصاره، بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی شامل باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* و گرم منفی *Escherichia coli*، *Vibrio parahaemolyticus*، *Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت. تمامی باکتری‌ها به صورت لیوفیلیزه از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند. باکتری‌ها ابتدا در محیط کشت نوترینت براث کشت شدند.و برای کشت آنها در پلیت از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد (Abubakar et al., 2012). به این ترتیب که ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت درون ظروف پتری ریخته شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. باکتری‌ها با غلظت ۰/۵ مک فارلند توسط سواپ پنبه استریل به صورت چمنی در پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شدند و بلافاصله دیسک‌های استریل توسط پنس استریل شده روی پلیت‌ها با فاصله مناسب از دیواره و از یکدیگر قرار داده شد. عصاره‌های بخش پوست، گناد و خار توسط سمپلر به میزان ۱۵ میکرولیتر از عصاره با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی دیسک‌ها ریخته شد. سپس پلیت‌ها به صورت وارونه در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوباتور به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از انکوبه کردن قطر ناحیه‌های مهار رشد توسط کولیس ورنیه با دقت اندازه‌گیری شد (Jahan et al., 2013; Abubakar et al., 2012).

حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی بخش‌های مختلف خیار دریایی

برای عصاره خیار دریایی به ازای هر باکتری از روش رقت لوله‌ای مایع استفاده شد. برای هر باکتری مجزا از یک سری لوله‌های ۹ تایی که ۷ لوله برای غلظت‌های مختلف هر عصاره (غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۴، ۴/۸، ۹/۶ و ۱۹/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، یک لوله به عنوان

شاهد مثبت (محیط کشت براث و باکتری) و یک لوله به عنوان شاهد منفی (محیط کشت براث به تنهایی) در نظر گرفته شد. به تمامی لوله‌ها به جز شاهد منفی، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری نیم مک‌فارلند اضافه و توسط سمپلر باکتری در محیط کشت مخلوط شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و آخرین لوله (کمترین غلظت) که هیچ کدورتی نداشت، به عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) در نظر گرفته شد (Nicolas, 2016). تمام لوله‌های فاقد کدورت برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های مورد نظر به روش پورپلیت کشت داده شدند. ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت فاقد رشد باکتری از لوله مورد نظر برداشته، در پلیت ریخته شد و ۱۹ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت آگار سرد شده به آن اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. کمترین غلظتی از عصاره که قادر به از بین بردن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها شود به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره در نظر گرفته شد (Nicolas, 2016).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تفاوت میانگین بین گروه‌های تیمار با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن (Duncan's Multiple Range) در سطح اطمینان ۰/۹۵ درصد در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد بررسی آماری قرار گرفت. کلیه نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 رسم شد. نتایج به صورت میانگین داده‌ها (از سه تکرار) ± انحراف معیار در هر غلظت ارائه شده است.

نتایج

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های خیار دریایی و توتیای دریایی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها برای نشان دادن توانایی جذب رادیکال‌های آزاد DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار IC_{50} عصاره خیار دریایی ۱۴۴۱/۲۵±۲۵/۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقدار IC_{50} برای توتیای دریایی ۲۴۴/۲۵±۲۳/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. IC_{50} برای اسید اسکوربیک ۳۵/۱۲±۱۸/۹۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

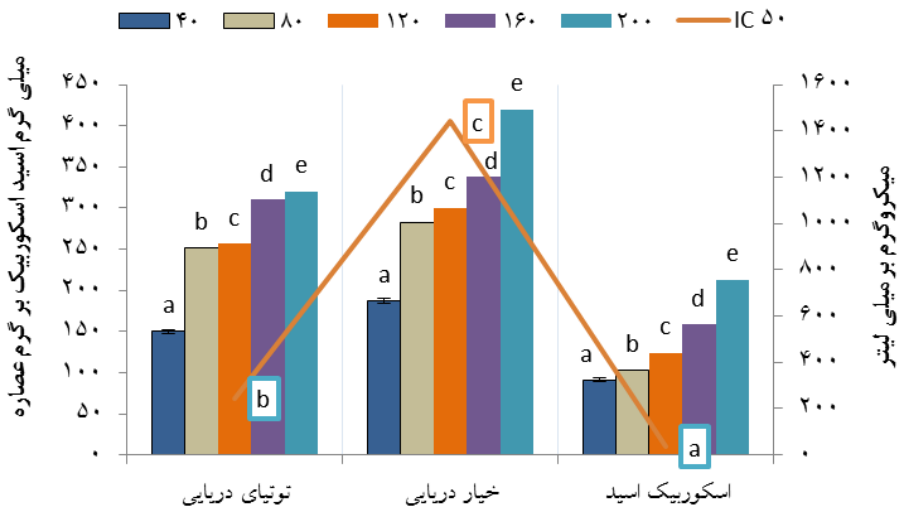
نمونه شاهد (اسید اسکوربیک) دارای توان بالاتری در جذب رادیکال‌های آزاد DPPH در مقایسه با عصاره خیار دریایی و توتیای دریایی بود. عصاره خیار دریایی پایین‌ترین قدرت مهار اکسیداسیونی را داشت.

نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره خیار و توتیای دریایی در شکل ۱ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره از ۴۰ به ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در توتیای دریایی در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میزان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH از ۱۵۰ به ۳۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در خیار دریایی از ۱۸۷ به ۴۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره رسید (P<۰/۰۵). با افزایش غلظت اسید اسکوربیک (شاهد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافت (P<۰/۰۵). در غلظت‌های مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره توتیای دریایی به شکل معنی‌داری کمتر از عصاره پپتیدی خیار دریایی بود (P<۰/۰۵). اسید اسکوربیک کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با خیار دریایی و توتیایی دریایی داشت (P<۰/۰۵).

توانایی مهار رادیکال DPPH عصاره پپتیدی توتیا و خیار دریایی و نیز شاهد (اسید اسکوربیک) به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ در غلظت‌های مختلف عصاره نشان داده شده است. در تمامی تیمارهای مورد بررسی، درصد مهار رادیکال آزاد، با افزایش غلظت افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). مقایسه بین توانایی مهار رادیکال DPPH توسط عصاره پپتیدی توتیا و خیار دریایی با شاهد اسید اسکوربیک، نشان دهنده قدرت مهار پایین‌تر این عصاره‌ها در هر دو جانور دریایی در مقایسه با شاهد بود (P<۰/۰۵).

حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره بخش‌های مختلف خیار دریایی

غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره بخش‌های مختلف خیار دریایی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در جدول ۳ نشان داده شده است. عصاره سه بخش گناد، پوست و خار توانست باکتری *Staphylococcus aureus* را مهار کند. گناد توانست تاثیر بازدارندگی و کشندگی بر روی باکتری *Bacillus cereus* و *Escherichia coli* داشته باشد. عصاره خیار دریایی نتوانست باعث مهار *Vibrio*، *Salmonella* و *Pseudomonas* شود.



شکل ۱: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های پپتیدی خیار دریای *Holothuria leucospilota* و توتیای دریایی *Echinometra mathaei* (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت در هر گروه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

جدول ۱: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره توتیای دریایی *Echinometra mathaei* (میانگین ± انحراف معیار)

غلظت عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (میلی‌گرم اسید اسکوربیک در گرم عصاره)	
	توتیای دریایی	شاهد (اسید اسکوربیک)
۴۰	۱۵/۲۰±۱/۱۱ ^{Aa}	۱۰۰/۱۴±۷/۹۱ ^{Ba}
۸۰	۱۸/۵۴±۲/۱۰ ^{Aa}	۹۰/۱۴±۳/۲۷ ^{Ba}
۱۲۰	۲۵/۱۱±۴/۱۰ ^{Ab}	۷۰/۵۰±۵/۹۵ ^{Bb}
۱۶۰	۳۰/۱۷±۲/۱۵ ^{Ab}	۵۰/۲۵±۵/۱۱ ^{Bc}
۲۰۰	۲۰/۲۱±۵/۱۵ ^{Ac}	۳۰/۱۰±۱/۴۰ ^{Bd}

حروف کوچک غیرمشابه به معنی وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشابه به معنی وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه مورد مطالعه و شاهد در هر غلظت (در هر ردیف) است (P<۰/۰۵).

جدول ۲: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره خیار دریایی *Holothuria leucospilota* (میانگین ± انحراف معیار)

غلظت عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (میلی‌گرم اسید اسکوربیک در گرم عصاره)	
	خیار دریایی	شاهد (اسید اسکوربیک)
۴۰	۱۶/۸۰±۲/۹۹ ^{Aa}	۳۳/۴۱±۴/۱۱ ^{Ba}
۸۰	۱۹/۴۵±۳/۱۱ ^{Aa}	۵۶/۱۱±۳/۸۷ ^{Bb}
۱۲۰	۳۸/۱۰±۳/۵۵ ^{Ab}	۷۶/۴۱±۳/۱۳ ^{Bc}
۱۶۰	۴۸/۰۰±۵/۹۵ ^{Abc}	۱۱۴/۱۰±۶/۹۹ ^{Bd}
۲۰۰	۵۶/۱۱±۳/۷۶ ^{Ac}	۱۵۷/۱۰±۱۰/۷۷ ^{Be}

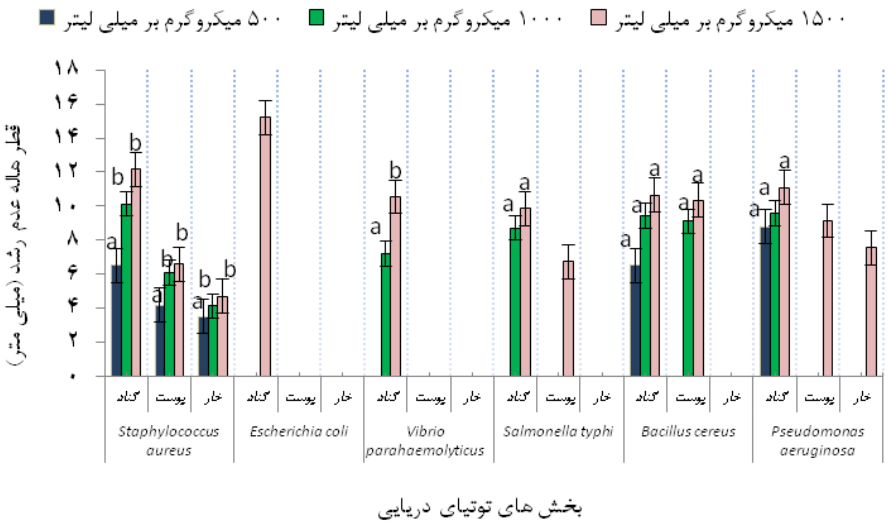
حروف کوچک غیرمشابه به معنی وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشابه به معنی وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه مورد مطالعه و شاهد در هر غلظت (در هر ردیف) است ($P<۰/۰۵$).

جدول ۳: حداقل غلظت‌های بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) عصاره بخش‌های مختلف خیار دریایی *Holothuria leucospilota*

باکتری	شاخص	غلظت عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)		
		پوست	گناد	خار
Staphylococcus aureus	**MIC**	۱۹/۲	۴/۸	۹/۶
	MBC	۱۹/۲	۹/۶	۱۹/۲
Bacillus cereus	**MIC**	-	۹/۶	-
	MBC	-	۱۹/۲	-
Escherichia coli	**MIC**	-	۹/۶	-
	MBC	-	۱۹/۲	-
Vibrio parahaemolyticus	**MIC**	-	-	-
	MBC	-	-	-
Salmonella typhi	**MIC**	-	-	-
	MBC	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	**MIC**	-	-	-
	MBC	-	-	-

بررسی فعالیت ضدمیکروبی (قطر هاله عدم رشد) عصاره بخش‌های مختلف توتیای‌دریایی

با توجه به این که از روش MIC برای عصاره توتیا نتایج دقیقی به دست نیامد، از روش قطر هاله عدم رشد استفاده شد. در هر سه بخش گناد، پوست و خار توتیای دریایی افزایش فعالیت ضدباکتریایی در مقابل *S. aureus* با افزایش غلظت عصاره روندی افزایشی داشت (شکل ۲). در هر سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، گناد بالاترین و خار کمترین قدرت مهار باکتری *Staphylococcus aureus* را داشت ($P<0/05$). عصاره گناد در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در دو غلظت ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به ترتیب توانستند تاثیر ضدباکتریایی بر روی *E. coli* و *V. parahaemolyticus* داشته باشند ($P<0/05$؛ شکل ۲). عصاره گناد در سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قدرت مهار *B. cereus* را داشت ($P<0/05$). در مورد عصاره پوست، غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فعالیت ضدباکتریایی مقابل *B. cereus* داشتند (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی فعالیت ضدباکتریایی (قطر هاله عدم رشد) غلظت‌های مختلف عصاره بخش‌های مختلف توتیای دریایی *Echinometra mathaei* (میانگین ± خطای استاندارد). حروف متفاوت در هر گروه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف است ($P<0/05$).

عصاره خار در غلظت‌های ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فعالیت ضدباکتریایی در مقابل *S. typhi* نداشت. در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، عصاره گناد در مقایسه با پوست فعالیت ضدباکتریایی بالاتری در مقابل *S. typhi* داشت (شکل ۲). روند افزایش فعالیت ضدباکتریایی عصاره گناد در مهار *P. aeruginosa* با افزایش غلظت عصاره معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) و در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت. در مورد دو عصاره پوست و خار، فقط در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، فعالیت ضدباکتریایی مشاهده شد ($P<۰/۰۵$؛ شکل ۲).

بحث

اقیانوس‌ها و دریاها بیش از ۷۰ درصد سطح زمین را فرا گرفته‌اند و منبع سرشاری از بسیاری از موجوداتی همانند ماهی، نرمتنان، دوکفه‌ای‌ها، سرپایان و سخت‌پوستان هستند که به سبب داشتن ترکیبات زیست‌فعال، نقش مهمی در فعالیت‌های اقتصادی و تحقیقاتی ایفا می‌کنند (Rizzetti et al., 2017). از آنجا که امروزه آنتی‌اکسیدان‌ها و ضدباکتری‌ها نقش مهمی در جلوگیری از بیماری‌های مختلف دارند و با توجه به دسترسی گسترده به این موجودات در ایران به واسطه همجاری با خلیج فارس، در این مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره خیار و توتیای دریایی مورد بررسی قرار گرفته است. اکسیداسیون یک واکنش ضروری در همه موجودات زنده است که سبب تشکیل رادیکال‌های آزاد و گونه‌های دیگر اکسیژن فعال (ROS) می‌شود که نقش مهمی در انتقال سیگنال‌ها دارند. از طرف دیگر رادیکال‌های آزاد می‌توانند سبب بیماری‌های زیادی در انسان شوند (Kulawik et al., 2013). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانع از اتصال اکسیژن به لیپید می‌شود و از طرفی با درگیرکردن رادیکال‌های آزاد از تخریب آنها جلوگیری می‌کند (Kong et al., 2016). در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در هر دو گونه دریایی با افزایش غلظت عصاره روندی افزایشی داشت، به طوری که در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های توتیا و خیاردریایی به ترتیب به ۳۲۰ و ۴۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسید. Zhou و همکاران (۲۰۱۸) عنوان کردند که قدرت احیاکنندگی خار توتیای دریایی *Strongylocentrotus nudus* وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، میزان قدرت احیا نیز افزایش می‌یابد. احتمالا حضور

اسیدهای آمینه هیدروفوب، در مهار پراکسیداسیون لیپید با افزایش حلالیت پپتیدها در لیپید و برهم‌کنش با رادیکال آزاد سهیم باشد. همچنین اسیدهای آمینه هیستیدین، پرولین، والین، گلیسین و لوسین موجود در توالی پپتید، در فعالیت جذب رادیکال سهیم هستند که توجیه کننده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره توتیا و خیاردریایی است (Puchalska et al., 2014; Sila et al., 2014). مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نشان داد که در تمامی غلظت‌های مورد بررسی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خیار دریایی بالاتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی توتیای دریایی بود ($P<۰/۰۵$). در گونه‌های توتیای دریایی و خیار دریایی غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره به ترتیب با ۲۰/۲۱ و ۵۶/۱۱ میلی‌گرم اسید اسکوربیک بیشترین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد را داشتند که در تمامی غلظت‌های عصاره فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH خیار دریایی بالاتر از توتیای دریایی بود. به طور کلی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی به عنوان جاذب رادیکالی، دهنده پروتون و شلاته کننده یون هستند. توالی پپتیدهای زیستی، عامل تعیین کننده در فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. حضور ریشه‌های اسید آمینه‌ای مشخص، بویژه هیستیدین، تیروزین، تریپتوفان، میتونین، سیستئین و پرولین به طور معناداری با فعالیت مهارکنندگی پپتیدها همبستگی دارد (Li et al., 2013). در مطالعه پیشه‌ورزاد و همکاران (۱۳۹۳) توان جذب رادیکال‌های آزاد BHT (Butylated Hydroxytoluene) در مقایسه با عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی دیواره بدن، لوله گوارش، گناد و درخت تنفسی دو گونه *Holothuria parva* و *H. leucospilota* بالاتر بود. Sciani و همکاران (۲۰۱۶) حضور پپتیدهایی مانند FLSY و PESL را در خیار دریایی *Arbacia lixula* عامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این گونه آبزی معرفی کردند.

در هر دو گونه مورد بررسی، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره توتیا و خیار دریایی در مقایسه با آسکوربیک اسید کمتر بود. در مطالعه سلیمانی و همکاران (۱۳۹۴) قدرت احیاکنندگی عصاره‌های ان‌هگزانی گناد، متانولی پوست و اتیل استاتی خار بیشتر از اسید اسکوربیک بود و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید آسکوربیک به عنوان بالاترین سطح غلظت، بهترین نتیجه را داشت. تفاوت در سطح غلظت عصاره و نوع عصاره (متانولی، اتیل‌استاتی و یا پپتیدی) دلیل احتمالی اختلاف بین نتایج دو مطالعه است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پپتیدهای استخراج شده از بافت‌های مختلف دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی متفاوتی بودند. تفاوت قدرت ضدباکتریایی عصاره اندام‌های مختلف در مطالعه اصلیان و همکاران (۱۳۹۴) روی *Echinometra mathaei* گزارش شده است. در مطالعه حاضر عصاره گناد خیار دریایی توانایی مهار سه باکتری *B. cereus*، *E. coli* و *S. aureus* را داشت. تاثیر استفاده از عصاره خیار دریایی بر روی باکتری *S. aureus* در مطالعه Shakouri و همکاران (۲۰۱۶) گزارش شده است. Li و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضدباکتریایی عصاره پپتیدی توتیای دریایی *Strongylocentrotus droebachiensis* را به علت داشتن پپتیدهای Centrocin ۱ و ۲ دانستند. Sciani و همکاران (۲۰۱۶) پپتیدهایی مانند DVKL، FLSY و LGSR را در گونه‌های *Arbacia lixula*، *Lytechinus variegatus* و *Echinometra lucunter* عامل فعالیت ضدمیکروبی گزارش کردند.

عصاره‌های استخراج شده از مایع سلومی و نیز خیارهای دریایی کامل *Holothuria scabra*، *Holothuria atra* و *H. leucospilota* تاثیر ضدباکتریایی در مقابل باکتری‌های *S. aureus*، *P. aeruginosa*، *Enterococcus faecalis*، *Vibrio damsela* و *E. coli* داشتند (Ibrahim, 2012). Brasseur و همکاران (۲۰۱۷) کارایی عصاره خیار دریایی *E. mathaei* و *Tripneustes gratilla* را برای مقابله با باکتری‌هایی مانند *B. subtilis* و Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) فعالیت ضدباکتریایی عصاره خیار دریایی *H. parva* را در برابر باکتری‌های *E. coli*، *P. aeruginosa* و *E. faecalis* اثبات کردند.

عصاره هر سه بخش گناد، پوست و خار توتیا نیز توانایی مهار باکتری *S. aureus* را داشتند و در هر دو گونه، عصاره گناد در مورد این باکتری قدرت مهار بالاتری در مقایسه با پوست و خار داشت. این فعالیت بالاتر با توجه به این که گناد در انتقال عوامل ایمنی به نسل بعد موثر است، قابل توجیه است (Ebrahimi et al., 2018). Asleian و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی خواص ضدمیکروبی اندام‌های مختلف توتیای دریایی *E. mathaei* سواحل جزیره ابوموسی دریافتند که فعالیت ضدباکتریایی آنها تحت تاثیر نوع بافت و نوع باکتری گرم مثبت یا منفی بود ($P<۰/۰۵$). فعالیت ضدباکتریایی پوست به عنوان اولین سد دفاع شیمیایی بدن علیه عوامل بیماری‌زا قابل توجیه است (Brasseur et al., 2017). شکوری و همکاران (۱۳۹۴) اثرات

ضدباکتریایی پوست توتیای دریایی گونه *E. mathaei* را در مقابل باکتری‌های گرم مثبت *E. faecalis* و *S. aureus* و گرم منفی *E. coli*، Uma و Parvathavarthini (۲۰۱۴) خاصیت ضدباکتری عصاره هیدروالکلی توتیای دریایی *Temnopleurus alexandri* را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند *E. coli* و Sciani و همکاران (۲۰۱۶) ترکیب Thymosin خیار دریایی *Strongylocentrotus purpuratus* را عامل فعالیت ضدباکتریایی گزارش کردند. از نظر تعداد باکتری‌های مهار شده توسط عصاره بخش‌های مختلف، عصاره استخراجی از پوست خیار دریایی و عصاره استخراجی از گناد در توتیای دریایی بالاترین تعداد باکتری‌های مهار شده را داشتند. تاثیر محدود فعالیت ضدباکتریایی عصاره خار در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی مانند *E. coli*، *P. aeruginosa*، *S. aureus* و *B. subtilis* در مطالعه راهی و همکاران (۱۳۹۶) نیز نشان داده شده است و آنها پیشنهاد کردند که بخش پوست و گناد برای استخراج و تخلیص ترکیبات تاثیر بیشتری دارند. ترکیبات پپتیدی تفاوت قابل ملاحظه‌ای در توالی اسیدهای آمینه و ساختار ساختمانی دارند و اکثر آنها دارای بار مثبت هستند. این ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی اجازه می‌دهد که این پپتیدها در آب قابل حل باشند و همچنین به طور همزمان با لایه هیدروفوب غشای باکتری هم میانکنش داشته باشند. این پپتیدها به دیواره غشای میکروارگانیسم‌ها چسبیده و غشا را بی‌ثبات می‌کنند، یا باعث ایجاد منفذ در سطح غشا می‌شوند و به این شکل سبب از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. همچنین بر اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های آنزیمی اثر گذاشته، باعث مرگ سلول باکتری می‌شوند (Venugopal, 2009). البته عموما پپتیدهای استخراجی از جانوران دارای عملکرد چند منظوره هستند و به طور همزمان در غشای سلولی و داخل سلولی اثر می‌گذارند (شکوری و همکاران، ۱۳۹۴؛ Hale and Hancock, 2007). در مجموع مطالعه حاضر اشاره بر این دارد که خارپوستان دریایی از جمله توتیای دریایی و خیار دریایی، می‌توانند منابعی غنی برای کشف ترکیبات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی جدید باشند. اما از نقطه نظر داروسازی، ترکیباتی می‌توانند انتخاب مناسبی برای کاربردهای دارویی باشند که هیچگونه اثرات جانبی نداشته باشند. بنابراین تخلیص ترکیبات فعال موجود در عصاره‌های خام حاضر

و بررسی‌های بیش‌تر آن‌ها برای استفاده در علم داروسازی ضروری است.

در مجموع، عصاره‌های خیار دریایی *Holothuria leucospilota* و توتیای دریایی *Echinometra mathaei* فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد را در تمامی غلظت‌های مورد بررسی داشت و با افزایش سطح عصاره این فعالیت افزایش یافت، به طوری که در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شد. فعالیت‌های ضدباکتریایی عصاره تحت تاثیر نوع بافت انتخابی بود. عصاره‌های هر سه بخش گناد، پوست و خار توتیا و خیار دریایی توانایی مهار باکتری *S. aureus* را داشتند. عصاره خیار دریایی توانایی مهار سه باکتری *S. aureus*، *B. cereus* و *E. coli* را داشت که گناد با مهار هر سه باکتری بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان داد. علاوه بر این، عصاره گناد توتیای دریایی بر مهار تمامی باکتری‌های مورد مطالعه تاثیر داشت. نتایج این مطالعه امکان استفاده از عصاره‌های توتیا و خیار دریایی را به عنوان یک ترکیب ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نشان داد.

منابع

اصلیان ح.، کامرانی ا.، یوسف‌زادی م. و کشاورزی م. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی. مجله بوم شناسی آبزیان، ۵(۳): ۱۴۴-۱۳۹.

پیشه‌ورزاد ف.، یوسف‌زادی م.، کامرانی ا.، معینی زنجانی ت.، علی احمدی آ. و کشاورز م. ۱۳۹۳. خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های دو گونه خیار دریایی خلیج فارس. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۴(۱): ۷-۱.

راهی س.، حیدری ب. و رسا م. ۱۳۹۶. اثرات عصاره‌های آلی و آبی استخراج شده از توتیای دریایی خلیج فارس (*Echinometra mathaei*) بر سه سویه بیماری‌زای قارچ *Candida*. مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۲(۳): ۴۵-۳۱.

سلیمانی س.، یوسف‌زاده م.، معین س.، امراللهی بیوکی ن.، کشاورز م. و اصلیان ح. ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای پلی‌فنلی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* خلیج فارس. مجله زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس، ۶(۲): ۸۲-۷۱

شکوری آ.، جوانمرد کامی قاضی محله ا. و سهیلی ف. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف استخراجی از اندام‌های توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) در ساحل چابهار. مجله زیست‌شناسی دریا، ۶(۲۵): ۸۲-۷۳.

Abubakar L., Mwangi C., Uku J. and Ndirangu S. 2012. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacologyand Therapeutics, 1(1): 19–23.

Althunibat O.Y., Ridzwan B.H., Taher M., Jamaludin M.D., Ikeda M.A. and Zali B.I. 2009. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. European Journal of Scientific Research, 37: 376–387.

Amarowicz R., Synowiecki J. and Shahidi F. 1994. Sephadex LH-20 separation of pigments from shell of red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*). Food Chemistery, 51: 227–229.

Amarowicz R., Synowiecki J. and Shahidi F. 2012. Chemical composition of shells from red (*Strongylocentrotus franciscanus*) and green (*Strongylocentrotus droebachiensis*) sea urchin. Food Chemistery, 133: 822–826.

Asleian H., Kamrany A., Yousefzadey M. and Keshavarz M. 2014. Antibacterial activity of

various extracts of the sea urchin *Echinometra mathaei*. Journal of Aquatic Ecology, 5: 139–144.

Brasseur L., Hennebert E., Fievez L., Caulier G., Bureau F., Tafforeau L., Flammang P., Gerbaux P. and Eeckhaut I. 2017. The roles of spinochromes in four shallow water tropical sea urchins and their potential as bioactive pharmacological agents, Marine Drugs, 15: 179–197.

Chen S.C., Xue L., Yin Q., Tang G. and Chai W. 2011. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. Carbohydrate Polymers, 83: 688–696.

Collin P.D. 2004. Peptides having anti-cancer and anti-inflammatory activity. United State Patent, 6: 767–890.

Ebrahimi H., Vazirizadeh A., Nabipour I., Najafi A., Tajbakhsh S. and Nafisi Bahabadi M. 2018. In vitro study of antibacterial activities of ethanol, methanol and acetone extracts from sea cucumber *Holothuria parva*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 17(3): 542–551.

Falkenberg S.S., Mikalsen S.O., Joensen H., Stagsted J. and Nielsen H.H. 2014. Extraction and characterization of candidate bioactive compounds in different tissues from salmon (*Salmo salar*). International Journal of Applied Research in Natural Products, 7: 11–25.

Ganesan P., Suresh Kumar K. and Subba Rao P.V. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12: 73–78.

Gowda N.M., Goswami U. and Khan M.I. 2008. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). Fish and Shellfish Immunology, 24(4): 450–458.

Hale J.D. and Hancock R.E. 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. Expert Review Anti Infective Therapy, 5: 951–959.

Haug T., Kjuul A.K., Styrvold O.B., Sandsdalen E., Olsen M.O. and Stensvag K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and *Asterias rubens* (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology, 81: 94–102.

Hing H.L., Kaswandi M.A., Azraul-Mumtazah R., Hamidah S.A., Sahalan A.Z., Normalawati S., Samsudin M.W. and Ridzwan B.H. 2007. Effect of methanol extracts from sea cucumbers *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus* on *Candida albicans*. Microscopy and Microanalysis Journal, 13: 270–275.

Ibrahim H.A.H. 2012. Antibacterial carotenoids of three *Holothuria* species in Hurghada, Egypt. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 38(3): 185–194.

Ireland C.M., Copp B.R., Foster M.D., McDonald L.A., Radisky D.C. and Swersey J.C. 1993. Biomedical potential of marine natural products. P: 1–43. In: Attaway D.H. and Zabrosky O.R. (Eds.). Marine Biotechnology: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. Plenum Press, USA.

Jahan N., Khatoon R., Shahzad A., Shahid M. and Ahmad S. 2013. Comparison of antibacterial activity of parent plant of *Tylophora indica* with its in vitro raised plant and leaf callus. African Journal of Biotechnology, 12(31): 4891–4896.

Jha R. and Zi-Rong X. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. Marine Drugs: 2(3): 123–146.

Kitagawa I., Nishino T. and Kyogoku Y. 1979. Structure of holothurin A a biologically active triterpene-oligoglycoside from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt. Tetrahedron Letters, 20(16):1419–1422.

Kong K.W., Mat-Junit S., Aminudin N., Hassan F.A., Ismail A. and Aziz A.A. 2016. Protective effects of the extracts of *Barringtonia racemosa* shoots against oxidative damage in Hep G2 cells. Peer Journal, 4: 1628–1632.

Kulawik P., Ozogul F., Glew R. and Ozogul Y. 2013. Significance of antioxidants for seafood safety and human health. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 475–491.

Kuwahara R., Hatate H., Chikami A., Murata H. and Kijidani Y. 2010. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography. LWT-Food Science and Technology, 43(8): 1185–1190.

Kuwahara R., Hatate H., Yuki T., Murata H., Tanaka R. and Hama Y. 2009. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*. LWT-Food Science and Technology, 42(7): 1296–1300.

Li Z., Jiang A., Yue T., Wang J., Wang Y. and Su J. 2013. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. Journal of Dairy Science, 96(7): 4242–4251.

Mourao P.A.S., Guimaraes B., Mulloy B., Thomas S. and Gray E. 1998. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: Sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. British Journal of Haematology, 101(4): 647–652.

Nicolas P. 2016. Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. The FEBS Journal, 276: 6483–6496.

Puchalska P., Marina M.L. and Garcia M.C. 2014. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. Food Chemistry, 148: 147–154.

Rizzetti T.M., De Souza M.P., Prestes O.D., Adaime M.B. and Zanella R. 2017. A simple and fast method for the determination of 20 veterinary drug residues in bovine kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Analytical Methods, 10: 854–864.

Roginsky A., Singh B., Ding X.Z., Collin P., Woodward C., Talamonti M.S., Bell R.H. and Adrian T.E. 2004. Frondanol (R)-A5p from the sea cucumber, *Cucumaria frondosa* induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. Pancreas, 39(5): 646–652.

Sciani J.M., Emerenciano A.K., Cunha Da Silva J.R.M. and Pimenta D.C. 2016. Initial peptidomic profiling of Brazilian sea urchins: *Arbacia lixula*, *Lytechinus variegatus* and *Echinometra lucunter*. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 22: 1–8 (17).

Shakouri A., Shoushizadeh M.R. and Nematpour F. 2016. Antimicrobial activity of sea cucumber (*Stichopus variegatus*) body wall extract in Chabahar Bay, Oman Sea. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 12(1): 32422–32427.

Sila A., Sayari N., Balti R., Martinez-Alvarez O., Nedjar-Arroume N. and Moncef N. 2014. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis. Food Chemistry, 148: 445–452.

Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S. and Fedorov S.N. 2008.

Constituents of the sea cucumber *Cucumaria okhotensis*. Structures of okhotosides B1-B3 and cytotoxic activities of some glycosides from this species. Journal of Natural Products, 71(3): 351–356.

Smith L.C., Ghosh J., Buckley K.M., Clow L.A., Dheilly N.M. and Haug T. 2010. Echinoderm immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology, 708: 260–301.

Sottorff I., Aballay V., Hernandez L.X., Munoz L.R., Silva M., Becerra J. and Astuya A. 2013. Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. Revisita de Biologia Marinay Oceanografia, 48(1): 23–25.

Taiyeb-Ali T.B., Zainuddin S.L.A., Swaminathan D. and Yaacob H. 2003. Efficacy of "Gamadent" toothpaste on the healing of gingival tissues: A preliminary report. Journal of Oral Science, 45(3): 153–159.

Thakur R., Yadav K. and Khadka K.B. 2013. Study of antioxidant, antibacterial and antiinflammatory activity of cinnamon (*Cinamomum tamala*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*). American Journal of Life Sciences, 1: 273–7.

Uma B. and Parvathavarthini R. 2014. Antibacterial activity of hydroalcohil extract of sea urchin *Temnopleurus alexandri*. Journal of Applied Research, 4: 1-10.

Venugopal V. 2009. Marine products for healthcare: Function and bioactive nutraceutical compound from the ocean. CRC Press Taylor and Francis Group, USA. 527P.

Wu M., Xu S., Zhao J., Kang H. and Ding H. 2010. Free-radical depolymerization of glycosaminoglycan from sea cucumber *Thelenata ananas* by hydrogen peroxide and copper ions. Carbohydrate Polymers, 80(4): 1116–1124.

Zhou D., Qin L., Zhu B., Li D., Yang J. and Dong X. 2018. Optimisation of hydrolysis of purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by response surface methodology and evaluation of in vitro antioxidant activity of the hydrolysate. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(8): 1694–1701.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 9, No. 4, Winter 2022

Research Paper

Antioxidant and antimicrobial activity of *Echinometra mathaei* and *Holothuria leucospilota*

Naser Abiyavi[1], Laleh Roomiani[2]*

Received: March 2021 Accepted: June 2021

Abstract

The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of sea cucumber *Holothuria leucospilota* and sea urchin *Echinometra mathaei* extracts on Gram-positive and Gram-negative bacteria, the antioxidant activity and inhibitory power of DPPH. Samples of sea cucumber and sea urchin were collected from around Qeshm Island. Antimicrobial activity of sea urchin was performed by examining the diameter of the growth inhibition zone and in sea cucumber by tube dilution method. Concentrations of 40, 80, 120, 160 and 200mg/mL were used to evaluate the antioxidant activity. The results showed that the antioxidant activity of the extracts of both animals increased with increasing the concentration of the extract ($P<0.05$) and at the concentration of 200mg/mL reached to 320±5.57 and 420±6.95mg of ascorbic acid/g of extract in sea urchin and sea cucumber, respectively. In all studied concentrations, the antioxidant activity of sea cucumber was higher than sea urchin ($P<0.05$). In both animals, the concentration of 200 mg/mL of peptide extract with 20.21±5.15 and 56.11±3.76mg of ascorbic acid/g, had the highest free radical scavenging power and in both species, DPPH inhibition activity was lower compared to ascorbic acid ($P<0.05$). Peptide extracts of all three parts of the gonads, skin and spines of the studied animals were able to inhibit *Staphylococcus aureus*. Concentrations of 1000 and 1500µg/mL of peptide extract of sea urchin gonad were able to inhibit all bacteria but no significant difference was observed between these two concentrations ($P>0.05$). The results of the present study showed that sea urchin and sea cucumber can be rich sources of antibacterial and antioxidant compounds. The results of the present study showed that sea urchin was able to show antibacterial effect on gram-negative bacteria.

Key words: *Extract, DPPH Free Radical, Gram-positive Bacteria, Gram-negative Bacteria*.

1- M.Sc. in Department of Food Sciences and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
*Corresponding Author: l.roomiani@yahoo.com