



مقاله علمی - پژوهشی:

## ارزیابی اثر ضد باکتریایی موکوس استخراج شده از ماهی گل خورک (*Periophthalmus waltoni* Koumans, 1941) از خوریات شمال غربی خلیج فارس

شبنم قجاوند\*<sup>۱</sup>، اشرف جزایری<sup>۱</sup>، اسماعیل داراب پور<sup>۲</sup>، محمدرضا آخوند<sup>۳</sup>

\*shabnamghojavand1988@gmail.com

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- گروه آمار، دانشکده علوم ریاضی و کامپیوتر، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱

### چکیده

موکوس مترشحه از اپیدرم ماهیان اولین خط دفاعی در مقابل پاتوژنهاست و آنها را در مقابل خطر تهاجم میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا محافظت می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه سه فاکتور غلظت‌های موکوسی، فصل و جنسیت به منظور ارزیابی خواص ضد باکتریایی موکوس ترشح شده از ماهی گل خورک (*Periophthalmus waltoni*) بر چهار سویه از باکتری‌های استاندارد *Escherichia coli* (۲۵۹۲۲)، *Staphylococcus aureus* (۶۵۳۸)، *Bacillus subtilis* (۶۶۳۶) و *Pseudomonas aeruginosa* (۹۰۲۷) در دو فصل گرم و سرد است. موکوس از سطح پوست ماهیان جمع‌آوری شده و فعالیت ضد باکتریایی آن با روش انتشار دیسک بررسی شد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) علیه دو باکتری که حساسیت بیشتری نشان دادند، تعیین شد. نتایج نشان داد که در هر دو دوره فصلی و در همه باکتری‌های مورد مطالعه براساس غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده از عصاره موکوسی، با افزایش غلظت عصاره موکوسی میانگین قطر هاله عدم رشد افزایش یافته و باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به عصاره مورد نظر بودند. در بررسی خاصیت ضد باکتریایی موکوس بر سویه‌های استاندارد براساس فاکتور فصل، موکوس به‌دست آمده در دوره فصلی گرم خاصیت ضدباکتریایی بالاتری نسبت به موکوس به‌دست آمده از دوره فصلی سرد داشت ( $p < 0.05$ ). همچنین عصاره موکوسی تهیه شده از ماهی در جنس ماده نسبت به نر با اینکه معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) ولی میانگین قطر هاله عدم رشد بیشتری بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان داد. اثرات ضد باکتریایی موکوس این ماهی وابسته به غلظت‌های موکوس (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود و میزان ترشح موکوس به‌طور تأثیرگذاری تحت تأثیر تغییرات فصلی و جنسیت قرار گرفت.

**لغات کلیدی:** مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ترکیبات طبیعی، گل خورک، خلیج فارس

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

منابع دارویی شیمیایی دارای اثرات جانبی و پایداری در محیط زیست بوده که برای غلبه بر این مشکل با توجه به مطالعات زیادی که در این زمینه انجام شده است، به این نتیجه رسیده‌اند که جانوران می‌توانند یک منبع دارویی طبیعی و امن برای مبارزه با میکرو ارگانیسم‌های مختلف انسانی باشند. در واقع، موجودات چند سلولی منبع بسیار خوبی از ترکیبات طبیعی هستند که در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها، تک یاخته‌ای‌ها و ویروس‌ها فعالیت دارند (Reverter *et al.*, 2018). جالب است که از میان مواد طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی طبق گزارش‌های صورت گرفته در این زمینه، موکوس ماهی منبع خوبی از ترکیبات زیست فعال برای اهداف بالینی مختلف است (Fuochi *et al.*, 2017).

سیستم ایمنی غیر اختصاصی (ذاتی) ماهیان نوعی سد مکانیکی فیزیکی است که اجزاء کلیدی آن شامل لایه موکوسی روی پوست، آبشش‌ها و مجرای معدی، روده‌ای و اجزاء تشکیل‌دهنده خون شامل سلول‌های کشنده طبیعی و فاگوسیت‌هاست (Esteban, 2012). در جانداران چند سلولی، لایه اپیتلیال در سطح بدن به عنوان مرز فیزیکی بین محیط داخلی و خارجی عمل می‌کند. در واقع، پوست ساختاری است که سطح بدن را پوشانده است و علاوه بر محافظت بدن در برابر عوامل بیماری‌زا از ورود آب، نمک یا مواد معدنی به داخل بدن جلوگیری می‌کند و به عنوان نخستین سد دفاعی بدن در برابر انواع تنش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی مطرح است (Salinas *et al.*, 2011). پوست در ماهیان استخوانی و گل‌خورد ماهیان از دو لایه درم و اپیدرم تشکیل شده است که سلول‌های ترشح‌کننده موکوس<sup>1</sup> و در لایه اپیدرم قرار دارند (Miller, 1973).

موکوس یک عامل ایمونولوژیک مهم در پوست ماهیان است که به عنوان یک مانع طبیعی، فیزیکی، بیوشیمیایی، پویا و نیمه تراو عمل می‌کند (Shephard, 1994). از این جهت می‌تواند به دلیل داشتن خواص ضد باکتریایی، مانع

ورود عوامل بیماری‌زای خارجی به بدن شود (Rottmann *et al.*, 1992). از نظر ساختار شیمیایی، موکوس اپیدرم در ماهیان شامل عوامل فعال زیستی متنوعی (کرینوتوکسین‌ها، کالمودولین، فرمون‌ها) و انواعی از مواد ضد عوامل بیماری‌زا (لیزوزیم، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاوآنزیم‌ها، ایمونوگلوبین‌ها) و پپتیدهای ضد میکروبی است (Liuro *et al.*, 2018) که گزارش‌های اخیر نشان داده است که پپتیدهای ضد میکروبی و سایر پروتئین‌های مربوط به ایمنی موکوس پوست ماهیان، در از بین بردن عوامل بیماری‌زا و میکروبی، تأثیر به‌سزایی دارند (Reverter *et al.*, 2018). موکوس دارای پروتئازهای مختلفی است که از سوئی، با فعال کردن و افزایش تولید سیستم کمپلمان، ایمونوگلوبین‌ها و پروتئین‌های ضد میکروبی نقش مهمی در ایمنی ذاتی ماهیان ایفاء می‌کنند و از سوی دیگر، می‌توانند با تأثیر بر پروتئین‌های موجود در ساختار باکتری‌ها، آنها را از بین ببرند یا به آنها آسیب برسانند (Ingram, 1980). همچنین یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های مطالعه شده در موکوس ماهیان آنزیم لیزوزیم است (Subramanian *et al.*, 2008). این آنزیم که خصوصیت ایمنی‌زایی قابل توجهی دارد، تحت تأثیر عواملی از قبیل رسیدگی جنسی، فصل، سن، دمای محیط و مواد محرک قرار می‌گیرد. از این‌رو، خواص ضد باکتریایی آن متغیر است (تکه و ایمانپور، ۱۳۸۷).

چندین مطالعه نشان‌دهنده استفاده بالقوه از خواص ضد میکروبی موکوس ماهی در درمان بیماری‌های انسان است (Pethkar and Lokhande, 2017). از این‌رو، در سال‌های اخیر علاقه‌مندی به بررسی خواص ضد میکروبی موکوس پوست ماهی افزایش یافته است (Reverter *et al.*, 2018). بنابراین، تحقیق در رابطه با خواص ضد باکتریایی موکوس پوست ماهیان در طول سال‌های متعددی و با رعایت روش‌های دقیق‌تر در حال گسترش است (Lee *et al.*, 2020).

پس از کپور ماهیان، گاو ماهیان بزرگترین خانواده از ماهیان استخوانی را شامل می‌شوند (Jaafar and Larson, 2008). برخی از گروه گاو ماهیان را تحت نام کلی گل‌خورد ماهیان معرفی می‌کنند. این ماهیان از رده

<sup>1</sup> Goblet cell

گل خورک ماهی به صورت زنده و با کمک اکواریوم‌های مخصوص جهت انجام بررسی‌های مربوط به خواص ضد باکتریایی موکوس و تعیین جنسیت به آزمایشگاه منتقل شدند. تعیین جنسیت با کمک پاپیلائی تناسلی انجام شد. بدین صورت که این پاپیلا برای افراد ماده به شکل بیضی و برای افراد نر به شکل مثلث است (کیوانی، ۱۳۸۴).

### جمع آوری موکوس پوست

موکوس ماهیان با استفاده از روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۸) با اندکی اصلاحات جمع‌آوری شد. پس از بیهوشی ماهیان با پودر گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) به منظور به حداقل رساندن باکتری‌های متصل به سطح بدن، ماهی‌ها درون آب سرد و تمیز وارد شدند و بلافاصله به صورت انفرادی درون کیسه‌های پلی اتیلنی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلراید ۵۰ میلی مولار قرار گرفتند. پس از مدت زمان دو دقیقه، ماهیان از کیسه‌ها خارج و به تشتی با اکسیژن دهی مناسب منتقل شدند. مخلوط موکوس و سدیم کلراید جمع‌آوری شده را درون لوله‌های فالكون ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰×g سانتریفیوژ شد و فاز رویی آن جدا و با توجه به شرایط موجود در آزمایشگاه در دمای معمولی اتاق خشک گردید. پودر خشک شده با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ وزن شد. سپس در آب مقطر (به عنوان حلال) حل شد. در نهایت عصاره مخلوط موکوسی جهت بررسی خواص ضد باکتریایی آن تهیه شد (Subramanian et al., 2008).

### فعالیت ضد باکتریایی

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک

بررسی فعالیت ضد باکتریایی موکوس پوست گل خورک ماهی گونه *P. waltoni* به روش انتشار دیسک انجام شد. باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش باکتری‌های استاندارد گرم منفی *Escherichia coli* (۲۵۹۲۲) استاندارد گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC ۹۰۲۷) و باکتری‌های استاندارد گرم مثبت

۱۱۳

ماهیان استخوانی، راسته سوف ماهی شکلان، خانواده گاو ماهیان و زیر خانواده اکسودرسینه هستند که اعضاء این زیر خانواده در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری در سواحل جزر و مدی با بستری نرم در نواحی غربی آفریقا، هند و اقیانوس آرام پراکنده‌اند (Clayton, 1993). گونه *Periophthalmus waltoni* (Koumans, 1941) از چهار گونه بومی منطقه خلیج فارس است که دارای بالاترین غنای گونه‌ای در ایران بوده و پراکنش آن از خلیج فارس تا غرب هند است (محمد پور و همکاران، ۱۳۸۹). زیستگاه اصلی گل‌خورک ماهیان، خور است که از دیدگاه اکولوژیک به واسطه موقعیت مکانی خود دارای خصوصیات ویژه‌ای است (Murdy, 1989). چون گل‌خورک ماهیان در ایران از ارزش اقتصادی برخوردار نیستند، مطالعات اندکی بر ویژگی‌های اکولوژیک، بیولوژیک و میکروبیولوژی آنها انجام شده است. لذا، هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص ضد باکتریایی موکوس پوست گل‌خورک ماهیان گونه *Periophthalmus waltoni* بر چهار گونه از باکتری‌های استاندارد (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa*) است.

### مواد و روش کار

#### نمونه‌برداری

منطقه شمال غربی خلیج فارس به واسطه عمق کم و ورود رودخانه‌های آب شیرین از سایر مناطق متمایز است. علاوه بر این، بزرگترین خوریات خلیج فارس در این ناحیه قرار دارند. مطالعه حاضر بر جوامع گل‌خورک ماهیان گونه *P. waltoni* در سطح خور معاوی به عنوان یکی از اصلی‌ترین انشعابات خور موسی (واقع در محدوده بخش بندر امام خمینی در شهرستان ماهشهر استان خوزستان) با مختصات جغرافیایی (عرض جغرافیایی "۲۴/۸'۳۰° و طول جغرافیایی "۳/۳۵'۴۹°) طی هشت ماه از تاریخ ۱۳۹۸/۹/۱۰ لغایت ۱۳۹۹/۴/۱۵ در ۴ نمونه‌برداری، انجام شد. نمونه‌برداری با دست و گاهی با تور ساچوک انجام شد. گونه مورد مطالعه به کمک کلید شناسایی معتبر شناسایی شد (Murdy, 1989). تعداد ۶۰ قطعه

فاقد رشد قابل مشاهده باکتری بودند، بر پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. حداقل غلظتی که از تشکیل کلونی در محیط آگار جلوگیری کرده بود، به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (Espinell-Ingroff *et al.*, 2002).

### روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

پس از استخراج داده‌ها و ثبت آنها در نرم افزار Excel و رزن (۲۰۰۸) آنالیز آماری به کمک افزارهای Spss و رزن (۲۰۱۵) و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس تک متغیره و چند متغیره انجام شد که در کلیه آزمون‌ها سطح معنی‌دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

#### اثر ضد باکتریایی موکوس بر باکتری‌های مورد مطالعه براساس تأثیر هم‌زمان فاکتورهای فصل و

#### غلظت

برای بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره موکوسی به‌دست آمده از گونه *P. waltoni*، با انجام آزمایش‌های اولیه صورت گرفته در این زمینه اثر ضد باکتریایی ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انتخاب شد و متعاقباً سه غلظت پایین‌تر با نسبت‌های یک‌دوم نیز برای بررسی بیشتر تعیین گردید. پس در نتیجه اثر ضد باکتریایی موکوس با تأثیر فاکتورهای فصل و غلظت با چهار غلظت مختلف (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰) در واحد حجمی میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده از موکوس پوست ماهی بر چهار باکتری استاندارد گرم منفی و گرم مثبت (*Escherichia coli*، *Bacillus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*) در دو دوره فصلی سرد و گرم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۱).

با توجه به جدول ۱، در دو دوره فصلی گرم و سرد هر چهار باکتری مورد مطالعه نسبت به عصاره موکوسی از خود حساسیت نشان دادند و میانگین قطر هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها و غلظت‌های موکوسی در مقایسه بین

*Staphylococcus aureus* (ATCC ۶۵۳۸) و *Bacillus subtilis* (ATCC ۶۶۳۶) بودند که از دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شدند. به طور خلاصه بعد از کشت فعال باکتری‌ها، برای رشد آنها در محیط کشت نوترینت براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۴ ساعت انکوبه شدند تا به غلظت نیم مک فارلند برسند. سپس در حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع تلقیح اولیه به وسیله سوآپ پنبه‌ای روی سطح پلیت‌های محتوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشیده شد. دیسک بلانک‌های استریل (۶ میلی‌متر) آغشته به عصاره موکوسی با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت آگار قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. (برای هر سویه باکتری سه بار تکرار در نظر گرفته شد) (Karting *et al.*, 1991).

#### سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) موکوس

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)<sup>۱</sup> از روش تهیه رقت‌های متوالی<sup>۲</sup> استفاده گردید. بدین منظور، ابتدا رقت متوالی از موکوس در لوله‌های استریل حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت TSB<sup>۳</sup> تهیه شد. رقت‌های موکوس تهیه شده شامل ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها سوسپانسیون باکتریایی با تراکم ۱۰<sup>۷</sup> از هر باکتری تهیه و به هر یک از رقت‌ها تلقیح گردید. سپس محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از موکوس که در آن کدورتی مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل کشندگی (MBC)<sup>۴</sup>، یک لوپ استاندارد از لوله‌هایی که

<sup>1</sup> Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

<sup>2</sup> Microdilution

<sup>3</sup> Tryptic Soy Broth (MSB)

<sup>4</sup> Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

دو دوره فصلی، اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.05$ )  
 به‌جز باکتری *Bacillus subtilis* که در غلظت موکوسی  
 ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری را از خود  
 نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

جدول ۱: نتایج اثر ضد باکتریایی میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره موکوسی با در نظر گرفتن فاکتورهای فصل و غلظت بر باکتری‌های مورد مطالعه

**Table 1: The results of the antibacterial effect of the mean diameter of the non-growth mucus extract considering the season and concentration factors on the studied bacteria**

دوره‌های فصلی		غلظت‌های موکوسی (میلی گرم بر میلی لیتر)	باکتری
سرد	گرم		
۱۵±۱/۳ <sup>bc</sup>	۱۹±۰/۸ <sup>a</sup>	۲۰۰	<i>Escherichia coli</i> (ATCC ۲۵۹۲۲)
۱۳±۰/۶ <sup>efg</sup>	۱۵±۰/۶ <sup>bcd</sup>	۱۰۰	
۱۱±۱/۳ <sup>hig</sup>	۱۳±۱/۰ <sup>ef</sup>	۵۰	
۸±۰/۴ <sup>L</sup>	۱۰±۰/۸ <sup>jk</sup>	۲۵	
۱۴±۰/۰ <sup>de</sup>	۱۵/۵±۰/۸ <sup>ab</sup>	۲۰۰	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC ۶۵۳۸)
۱۲±۰/۹ <sup>fgh</sup>	۱۴±۰/۷ <sup>cde</sup>	۱۰۰	
۹/۶±۰/۵ <sup>k</sup>	۱۱/۸±۰/۷ <sup>ghi</sup>	۵۰	
۸±۰/۶ <sup>L</sup>	۱۰±۰/۶ <sup>jk</sup>	۲۵	
۱۵/۸±۰/۷ <sup>b</sup>	۱۸/۵±۰/۵ <sup>a</sup>	۲۰۰	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC ۶۶۳۳)
۱۳±۰/۴ <sup>ef</sup>	۱۵±۰/۵ <sup>bc</sup>	۱۰۰	
۱۱±۱/۰ <sup>hig</sup>	۱۳±۰/۵ <sup>ef</sup>	۵۰	
۱۰±۱/۰ <sup>jk</sup>	۱۰/۵±۱/۳ <sup>igk</sup>	۲۵	
۱۰±۰/۷ <sup>jk</sup>	۱۱/۵±۰/۵ <sup>hi</sup>	۲۰۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC ۹۰۲۷)
۷/۶±۰/۸ <sup>L</sup>	۹/۶±۰/۵ <sup>k</sup>	۱۰۰	
۰/۰±۰/۰ <sup>m</sup>	۸±۰/۵ <sup>L</sup>	۵۰	
۰/۰±۰/۰ <sup>m</sup>	۷/۵±۰/۵ <sup>L</sup>	۲۵	

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$

حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به عصاره مورد نظر شناخته شدند.

با توجه به جدول ۲، در بررسی خاصیت ضد باکتریایی موکوس طی دو دوره فصلی گرم و سرد ضمن بررسی اثر متقابل بین دو عامل فصل و باکتری بدون در نظر گرفتن تاثیر غلظت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری بین این دو عامل مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). عصاره موکوسی تهیه شده در دوره فصلی گرم نسبت به عصاره موکوسی تهیه شده در دوره فصلی سرد بر علیه سویه‌های استاندارد دارای میانگین قطر هاله عدم رشد بیشتری بود. علاوه بر این،

نتایج نشان داد که خاصیت ضد باکتریایی عصاره موکوس با افزایش غلظت افزایش می‌یابد و برای تمام باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، بزرگترین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت موکوسی ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کوچکترین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت موکوسی ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که در هر دو دوره فصلی باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب در غلظت‌های موکوسی ۲۰۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان

رشد در دوره فصلی سرد و در باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* (با میانگین ۶/۸ میلی‌متر) مشاهده شد.

بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilis* در دوره فصلی گرم (با میانگین ۱۴/۵ میلی‌متر) و کمترین میانگین قطر هاله عدم

جدول ۲: نتایج اثر ضد باکتریایی میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره موکوسی با در نظر گرفتن فاکتور فصل بر باکتری‌های مورد مطالعه  
Table 2: The results of the antibacterial effect of the mean diameter of the non-growth mucus extract on the studied bacteria, considering the season factor

دوره‌های فصلی		باکتری
سرد	گرم	
۱۱/۸± ۲/۸ <sup>c</sup>	۱۴± ۳/۴ <sup>a</sup>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC ۲۵۹۲۲)
۱۱± ۲/۴ <sup>d</sup>	۱۳± ۲/۳ <sup>b</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC ۶۵۳۸)
۱۲/۵± ۲/۴ <sup>b</sup>	۱۴/۵± ۳/۰ <sup>a</sup>	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC ۶۶۳۳)
۶/۸± ۴/۶ <sup>f</sup>	۹± ۱/۶ <sup>e</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC ۹۰۲۷)

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$

حساس‌ترین باکتری و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۶/۸ میلی‌متر در جنس نر به عنوان مقاوم‌ترین باکتری در این مطالعه شناخته شد (شکل ۱).

#### حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و کشندگی (MBC)

در این سنجش فقط از باکتری‌های *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* که دارای حساسیت نسبتاً زیاد در برابر عصاره تهیه شده از موکوس ماهی گونه *P. waltoni* بودند، استفاده شد. نتایج نشان داد، در دوره فصلی سرد مقدار حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) برای هر دو باکتری ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای هر دو باکتری به دست آمد. همچنین مطالعات انجام شده در دوره فصلی گرم نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی برای باکتری‌ها غلظت ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی برای آنها غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. لذا، می‌توان نتیجه گرفت که در رابطه با هر دو باکتری، عصاره موکوسی تهیه شده در دوره فصلی گرم دارای خاصیت ضد باکتریایی بالاتری بود.

#### اثر ضد باکتریایی موکوس بر باکتری‌های مورد مطالعه بر اساس تاثیر همزمان فاکتورهای غلظت و جنسیت

با توجه به جدول ۳، بیشترین خاصیت ضد باکتریایی موکوس در ماهیان ماده در غلظت موکوسی ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به غلظت موکوسی ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است که از ماهیان نر تهیه شد و فقط در باکتری *Escherichia coli* در غلظت موکوسی ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و *Bacillus subtilis* در غلظت موکوسی ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری بین دو جنس مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) در حالی که در سایر موارد موکوس تهیه شده از جنس ماده فقط مقدار جزئی خاصیت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به جنس نر داشت با وجود این که تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

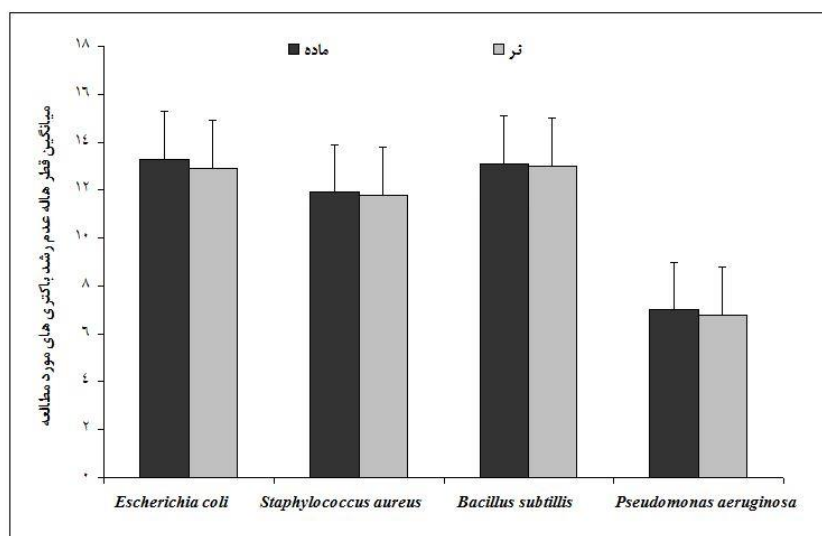
حتی بدون در نظر گرفتن عامل غلظت، میانگین قطر هاله عدم رشد در عصاره موکوسی تهیه شده از هر دو جنس بر علیه سویه‌های استاندارد، اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). با این وجود، همچنان موکوس تهیه شده از جنس ماده نسبت به نر خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری از خود نشان داد و باکتری *Escherichia coli* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۳/۳ میلی‌متر در جنس ماده،

جدول ۳: نتایج اثر ضد باکتریایی میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره موکوسی با در نظر گرفتن فاکتورهای جنسیت و غلظت بر باکتری‌های مورد مطالعه

Table 3: The results of the antibacterial effect of the mean diameter of the non-growth mucus extract considering the factors of gender and concentration on the studied bacteria

جنسیت	غلظت‌های موکوسی		باکتری
	ماده	(میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	
نر	۱۸±۱/۸ <sup>a</sup>	۲۰۰	<i>Escherichia coli</i> (ATCC ۲۵۹۲۲)
۱۶±۲/۳ <sup>b</sup>	۱۴/۵±۱/۵ <sup>c</sup>	۱۰۰	
۱۱/۸±۱/۰ <sup>d</sup>	۱۲/۵±۲/۱ <sup>de</sup>	۵۰	
۹±۰/۸ <sup>i</sup>	۹/۵±۱/۴ <sup>i</sup>	۲۵	
نر	۱۵±۱/۳ <sup>c</sup>	۲۰۰	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC ۶۵۳۸)
۱۴/۵±۰/۸ <sup>c</sup>	۱۳/۵±۱/۳ <sup>d</sup>	۱۰۰	
۱۲/۵±۰/۹ <sup>c</sup>	۱۰/۸±۱/۷ <sup>ef</sup>	۵۰	
۱۰/۵±۰/۸ <sup>efg</sup>	۹/۵±۱/۲ <sup>hi</sup>	۲۵	
نر	۱۷/۵±۱/۸ <sup>ab</sup>	۲۰۰	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC ۶۶۳۳)
۱۷±۱/۲ <sup>ab</sup>	۱۴/۳±۱/۳ <sup>c</sup>	۱۰۰	
۱۴±۱/۳ <sup>c</sup>	۱۲/۵±۰/۵ <sup>d</sup>	۵۰	
۱۱/۸±۲/۰ <sup>de</sup>	۱۱/۵±۰/۷ <sup>ef</sup>	۲۵	
نر	۱۱/۵±۰/۷ <sup>ef</sup>	۲۰۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC ۹۰۲۷)
۹/۵±۰/۸ <sup>ghi</sup>	۹±۰/۸ <sup>i</sup>	۱۰۰	
۷±۴/۵ <sup>j</sup>	۷/۵±۴/۵ <sup>j</sup>	۵۰	
۶/۵±۴/۳ <sup>j</sup>	۶/۸±۱/۶ <sup>j</sup>	۲۵	

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$



شکل ۱: مقایسه اثر ضد باکتریایی عصاره موکوسی در دو جنس بر باکتری‌های مورد مطالعه

Figure 1: Comparison of the antibacterial effect of mucus extract in two species on the studied bacteria

## بحث

به رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه بهداشت و کاربرد روش‌های نوین، یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی مقابله با عوامل ایجادکننده بیماری‌های عفونی به دلیل شیوع و گسترش بالای آن است. افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بشر را مجبور به استفاده از ترکیبات ضد میکروبی جدید و طبیعی کرده است (Trick et al., 2001). مطالعات مختلف نقش حفاظتی موکوس و ترکیبات آن در گونه‌های مختلف ماهی، نشان می‌دهد که موکوس اپیدرمی به عنوان اولین خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (Wang et al., 2019). با این وجود، اطلاعات کمی در رابطه با فعالیت ضد باکتریایی ترشحات موکوسی اپیدرم پوست گل‌خورک ماهیان در دسترس است (Ravi et al., 2010).

از این‌رو، در این مطالعه با در نظر گرفتن تأثیرات پارامترهای فصلی و جنسیتی خاصیت ضد باکتریایی موکوس این گونه از گل‌خورک ماهیان در غلظت‌های متفاوت بر باکتری‌های مختلف استاندارد در سواحل غربی خلیج فارس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره موکوسی تهیه شده از پوست ماهی دارای خاصیت ضد باکتریایی است که اثر ضدباکتریایی آن کاملاً وابسته به غلظت است به طوری که در غلظت‌های موکوسی بالاتر اثر ضد باکتریایی بیشتری علیه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی مشاهده شد و از بین باکتری‌های مورد مطالعه باکتری‌های *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* به عنوان حساس‌ترین باکتری‌ها و باکتری *aeruginosa Pseudomonas* به عنوان مقاوم‌ترین باکتری شناخته شدند.

در مطالعه Balasubramanian و همکاران (۲۰۱۲) بر فعالیت ضد باکتریایی موکوس ماهی گونه *Ctenopharyngodon idella* از خانواده کپور ماهیان، مشخص شد که عصاره موکوسی گونه مورد نظر بر علیه باکتری *Klebsiella pneumonia* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۷ میلی‌متر دارای کمترین تاثیر بود درحالی‌که باکتری‌های *aeruginosa Pseudomonas* و *Escherichia coli* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵ و

۱۷ میلی‌متر، بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره موکوسی از خود نشان دادند که این نتایج در رابطه با باکتری *Escherichia coli* به عنوان حساس‌ترین باکتری با نتایج حاضر هم‌خوانی داشت ولی در رابطه با باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به عنوان مقاوم‌ترین باکتری در این تحقیق هم‌خوانی نداشت. در مطالعه Kumari و همکاران (۲۰۱۱) که به بررسی فعالیت ضدباکتریایی موکوس ماهیان گرمسیری و ماهیان آب شیرین پرداختند، باکتری *Staphylococcus aureus* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر به عنوان یکی از حساس‌ترین باکتری‌ها و باکتری *Escherichia coli* که هیچ‌گونه تأثیر ضد باکتریایی نسبت به عصاره موکوسی نشان نداد، به عنوان یکی از مقاوم‌ترین باکتری‌ها شناخته شدند. با این‌که نتایج این آزمایش در نهایت به خواص ضد باکتریایی موکوس ماهی تأکید داشت که از این نظر با نتایج موجود در این پژوهش هم‌راستا بود، اما از نظر نوع واکنش باکتری‌ها نسبت به عصاره موکوسی با نتایج این تحقیق هم‌خوانی نداشت.

نتایج تاثیر فاکتور فصل بر خواص ضدباکتریایی موکوس گونه *P. waltoni* نشان داد که تغییرات فصول نقش به‌سزایی در میزان و ماهیت ترکیب موکوس ماهی ایجاد می‌کند به طوری که اثر ضد باکتریایی عصاره موکوسی در دوره فصلی گرم نسبت به دوره فصلی سرد، میانگین بالاتری را نشان داد که می‌توان نتیجه گرفت، با توجه به اینکه شرایط استرس‌زا و محیطی تاثیر زیادی در تولید سلول‌های موکوسی در ماهیان دارد، از این رو در دوره فصلی گرم که اوج رسیدگی جنسی و تخم‌گذاری این ماهیان است، بدن ماهیان حساسیت بالایی را نسبت به تنش ای محیطی نشان می‌دهد و همین امر موجب تولید موکوس بیشتر این گونه از ماهیان در این دوره فصلی شده است (Bereiter-Hahan et al., 1986) در مطالعه Swain و همکاران (۲۰۰۷) به منظور بررسی میزان پارامترهای مختلف ایمنی غیر اختصاصی در فصول مختلف سال بر کپور بزرگ هندی *Labeo rohita* بیان شد که میزان سطوح خاصیت ضدباکتریایی ترکیبات موکوس پوست در این ماهی در فصل زمستان که دوره فصلی

ذاکر و همکاران (۱۳۹۴) بر لیزوزیم موجود در موکوس پوست ماهی سفید دریای خزر اشاره کرد که به روشنی نشان داد که عامل جنسیت بر پارامتر لیزوزیم موکوسی موثر نبوده است و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی نداشت. همچنین Wang و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که فعالیت سیستم ایمنی ماهی گونه *Perca fluviatilis* از خانواده سوف ماهیان بین دو جنس نر و ماده در دوره‌های تولید مثل متفاوت بوده است به طوری که فعالیت جنس ماده نسبت به جنس نر بالاتر گزارش شد که با توجه به این‌که در این پژوهش فعالیت جنس ماده بر اساس مقدار موکوس تولیدی اندکی بیشتر از جنس نر گزارش شد، دقیقاً با نتایج این تحقیق هم‌راستا بود.

در یک نتیجه‌گیری کلی از بررسی خواص ضدباکتریایی موکوس در گل‌خورک ماهیان می‌توان بیان کرد که از بین باکتری‌های مورد سنجش، باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب به عنوان حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به عصاره موکوسی ماهی موردنظر بودند. در مقایسه بین فصول موکوس تهیه شده از ماهی در دوره فصلی سرد نسبت به گرم، خاصیت ضد باکتریایی بالاتری بر همه باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان داد و موکوس تهیه شده از ماهی ماده اندکی خاصیت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به جنس نر داشت.

پس با نتایج موجود می‌توان بیان کرد که موکوس این ماهیان علاوه بر داشتن خاصیت روان‌کنندگی حرکت ماهی، دارای خاصیت ضد باکتریایی با طیف اثر وسیع بوده و میزان تاثیر آن وابسته به فصل (با در نظر گرفتن فاکتور دمای محیط) و تا حدی جنسیت است. در واقع، دیدگاه مثبت این تحقیق کارایی موکوس پوست این گونه از ماهیان به عنوان یک منبع جدید حاوی ترکیبات ضد میکروبی برای مقابله با پاتوژن‌های بیماری‌زاست. لذا، پیشنهاد می‌شود، در مطالعات بعدی تأثیر فاکتور فصل و جنسیت بر خاصیت ضد باکتریایی موکوس ماهیان بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

سردی به‌شمار می‌رود، در مقایسه با سایر فصل‌ها در پایین‌ترین حد خود قرار داشت که دقیقاً با نتایج این پژوهش هم‌خوانی داشت. در مطالعه فرزادفر و همکاران (۱۳۹۲) در رابطه با بررسی خاصیت ضد باکتریایی لیزوزیم موکوس ماهی سفید گونه (*Rutilus kutum*) از خانواده کپور ماهیان در دریای خزر، مشخص شد که غلظت لیزوزیم موکوس در ماه‌های سرد سال به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد که پایین بودن سطح لیزوزیم در موکوس پوست به دلیل کاهش میزان فعالیت بدن و نیز کاهش عوامل پاتوژن در محیط سرد آب است که کاملاً با تحقیقات صورت گرفته در این پژوهش که نشان‌دهنده کاهش میزان فعالیت ضدباکتریایی موکوس در فصل سرد با توجه به نتایج به‌دست آمده بود، مطابقت داشت. نتایج این یافته‌ها نشان می‌دهد که تغییرات فاکتورهای محیطی زیستگاه از جمله دما می‌تواند نقش به‌سزایی در میزان تولید و ماهیت موکوس این ماهی داشته باشد.

در بررسی تاثیر متقابل بین عصاره موکوسی تهیه شده از جنس‌های نر و ماده، با این‌که اختلاف معنی‌داری بین این دو جنس مشاهده نشد، ولی با این‌حال ترکیب موکوس پوست ماهی ماده نسبت به ماهی نر مقدار بیشتری بود. شواهد نشان می‌دهد که کارایی غذا، قابلیت هضم پروتئین و انرژی و نیز قابلیت استفاده از این پروتئین‌ها در مراحل مختلف زندگی و وزن ماهیان متفاوت است به طوری که ماهیان بزرگتر از کارایی بیشتری در ذخیره پروتئین به‌خصوص پروتئین‌های دفاعی نسبت به ماهیان کوچکتر برخوردارند (Azevedo et al., 1998). از این‌رو، با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان کرد که در همه باکتری‌های مورد مطالعه، موکوس تهیه شده ماهی در جنس ماده نسبت به جنس نر دارای خاصیت ضد باکتریایی بالاتری است و باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* در عصاره موکوسی تهیه شده از جنس ماده به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را از خود نشان دادند. تاکنون مطالعه چندانی در زمینه تاثیر جنسیت بر موکوسی تولیدی از گل‌خورک ماهیان صورت نگرفته است. با این‌حال، از تحقیقات مشابه صورت گرفته در این زمینه می‌توان به نتایج تحقیقات

- idella*). *African Journal of microbiology Research*, 6(24): 5110-5120. Doi: 10.5897/AJMR
- Bereiter-Hahan, J., Matoltsay, A. and Sylvia Richarads, K., 1986.** Biology of the integument. *Springer Nature*, 111-135. Doi: 10.1007/978-3-662-00989-5
- Clayton, D.A., 1993.** Mudskipper, oceanography and marine. *Biology Annual Review*, 31:507-577
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. and Walsh, T., 2002.** Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* NCCLS collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9): 3204-3208. Dio: 11.28/JCM. 40.9.3204-3208.2002.
- Esteban, M.Á., 2012.** An overview of the immunological defenses in fish skin. *International Scholarly Research Notices*, 57: 353-357. Doi: 10.5402/2012853470
- Fuochi, V., Livolti, G., Camiolo, G., Tiralongo, F., Giallongo, C. and Diste-Fano, A., 2017.** Antimicrobial and antiproferative effects of skin mucus derived from *Ddasyatis pastinaca* (Linnaeus 1758) . *Journal of Marinedrugs*, 15(11):348. Doi: 10.3390/mol 15110342.
- Ingram, G.A., 1980.** Substances involved in the natural resistance of fish to infection, a review. *Journal of Fish Biology*, 16: 23-60. Doi:10.1111/j.10958649-1980.tb03685.x
- منابع**
- تکه، ش. و ایمانپور، م. ر.، ۱۳۸۷. اثرات برخی صفات ثانویه جنسی روی خصوصیات زیستی مایع منی در ماهی سفید، (*kutum Rutilus*) پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، (۱۵): ۸۱-۸۰.
- ذاکر، ف.، ایمان پور، ج.، ستاری، م. و هادوی، م.، ۱۳۹۴. فعالیت لایزوزیم سرم خون و موکوس پوست ماهی سفید دریای خزر (*kutum Rutilus*) در اکوسیستم آب لب شور و آب شیرین. نشریه توسعه آبرزی پروری، (۱): ۶۱-۵۳
- فرزاد فر، ف.، حیدری، ب. و آقا معالی، م.، ۱۳۹۲. اثر دما؛ مراحل رسیدگی جنسی و مهاجرت بر سیستم ایمنی غیر اختصاصی سرم و مخاط جنس نر ماهی سفید دریای خزر با تأکید بر لیزوزیم. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، (۲): ۳۸-۵۳
- کیوانی، ی.، ۱۳۸۴. زیست شناسی ماهی ها. اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، مرکز نشر، چاپ اول، ۴۳۸ صفحه.
- محمدپور، ز.، نبوی، م. و دهقان مدیسه، س.، ۱۳۸۹. بررسی تغییرات فصلی رژیم غذایی ماهی گل خورک *Periophthalmodon schlosseri* براساس شاخص وقوع در سواحل جزر و مدی خور سماعیلی ماهشهر. مجله بیولوژی دریا، ۹۲-۱۰۲
- Azevedo, P.A., Cho, C.Y. and Bureau, D.P., 1998.** Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatc Living Resources*, 11: 227-238. Doi: 10.1016/SO990-7440(98)89005-0
- Balasubramanian, S., Babyrani, P., Arulprakash, A. and Prakash, M., 2012.** Antimicrobial Prperties of skin mucus from four freshwater cultivable Fishe (*Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Labeo rohita* and *Ctenopharyn godon*

- Jaafar, Z. and Larson, L., 2008.** A new species of mudskipper, *Periophthalmus takita* from australia with a key to the genus. *Zoological Science*, 25(9):946-952. Doi:10.2108/ZSj.25946
- Karting, T., Still, F. and Reinthaler, F., 1991.** Antimicrobial activity of the essential oil of young pine shoots. *Journal Ethnopharmacology*, 35: 155-157. Doi: 10.1016/0378-8741(91)90067-n
- Kumari, U., Nigam, A.K., Mittal, S. and Mittal, A.K., 2011.** Antibacterial properties of the skin mucus of the freshwater fishes, *Rita rita* and *Channa punctatus*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15: 781-786.
- Lee, Y., Bilung, L.M., Sulaiman, B. and Chong, Y.L., 2020.** The antibacterial activity of fish skin mucus with various extraction solvents and their in-vitro evaluation methods. *International Aquatic Research*, 12(1): 1-21. Doi:10.22034/IAR(20).2020.670998
- Lirio, J.A.C., Deleon, J.A.A. and Villafuerte, A.G., 2018.** Antimicrobial activity of epidermal mucus from top aquaculture fish species against medically-important pathogens. *Walailak Journal of Science and Technology*, 16(5): 329-340. Doi:10.48048/wjst.2019.6287.
- Miller, P., 1973.** The osteology and adaptive features of *Rhyacichthys aspro* (Teleostei: Gobioidae) and the classification of gobioid fishes. *Journal of Zoology*, 171: 397-434. Doi: 10.1111/j.1469-7998.1973.tb05347.x
- Murdy, E., 1989.** A taxonomic revision and cladistic analysis of the oxudercine Gobies. *Records of Australian Museum*, 11:1-9
- Pethkar, M.R. and Lokhande, M.V., 2017.** Antifungal activity of skin mucus of three cultivable fish species (*Catla catla*, *Cirrhinus mrigala* and *Anguilla anguilla*). *International Journal of Zoology*, 2: 01-03.
- Ravi, V., Kesavan, K., Sandhya, S. and Rajagopal, S., 2010.** Antibacterial activity of the mucus of mudskipper *Boleophthalmus boddarti* (Pallas, 1770) from Vellar Estuary. *International Journal of Bioflux Society*, 2(1): 11-14
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. and Sasal, P., 2018.** Biological and ecological roles of external fish mucus: a review. *Fishes*, 3:41. Doi: 10.3390/fishes3040041
- Rottmann, R.W., Francis-Floyd, R. and Durborow, R., 1992.** The role of stress in fish disease *Southern Regional Aquaculture Center*, SRAC Publication No. 474..
- Salinas, I., Zhang, Y.A. and Sunyer, J.O., 2011.** Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12): 1346-1365. Doi:10.1016/j.dci.2011.11.009
- Shephard, K.L., 1994.** Functions for fish mucus: *Review Fish Biological Fish*, 4:401-429. Doi: 10.1007/BF00042888
- Subramanian, S., Ross, N.W. and MacKinnon, S.L., 2008.** Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative*

- Biochemistry And Physiology*,15:85-92.  
doi:10.1016/j.cbpb.2008.01.011
- Swain, P., Dash, S. and Sahoo, P.K., 2007.** Non-specific immune parameters of brood indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 38-43. Doi: 10.1016/j.fsi.2006.03.010
- Trich, W.E., Weinstein, R.A., Demarais, P.L., Kuehnert, M.J, Tomaska, W., Nathan, C., 2001.** Colonization of skilled-care facility residents with antimicrobial-resistant pathogens. *National Center For Biotechnology Information*, 49(3):270-6. Doi: 10.1046/j. 1532-5415.2001.4930270.x
- Wang, H., Tang, W., Zhang, R. and Ding, S., 2019.** Analysis of enzyme activity, antibacterial activity, antiparasitic activity and physico-chemical stability of skin mucus derived from *Amphiprion clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 86: 653-61. Doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.066
- Wang, N., Migaud, L., Acerete, L., Gardeur, N.J., Tort, L. and Fontaine, P., 2003.** Response of Eurasian perch *Perca fluviatilis* during the spawning season. *Fish physiology and Biochemistry*, 25:523-524. Doi:10.1023/B.FISH.0000030651.17323.de

**Evaluation of the antibacterial effect of the mucus extracted from the mudskipper, *Periophthalmus waltoni* (Koumans, 1941) from estuaries in the northwestern of the Persian Gulf**

Ghojavand Sh.<sup>1\*</sup>; Jazayere A.<sup>1</sup>; Darabpour E.<sup>2</sup>; Akhoond M.R.<sup>3</sup>

\*shabnamghojavand1988@gmail.com

1-Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2-Department of Microbiology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Department of Statistics, Faculty Mathematical Science and Computer, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

**Abstract**

The mucus secreted from the epidermis of fish is the first line of defense against pathogens and protects them from the risk of invading pathogenic microorganisms. The purpose of this study is to investigate and compare the three factors of mucus concentration, season, and sex in order to evaluate the antibacterial properties of the secreted mucus from a mudskipper (*Periophthalmus waltoni*) on four strains of standard bacteria including *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (6538), *Bacillus subtilis* (6633), and *Pseudomonas aeruginosa* (9027) in both hot and cold seasons. Mucus was collected from the surface of fish skin and its antibacterial activity was evaluated by disc diffusion method. Also, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined against the two bacteria that showed more sensitivity. The results showed that in both seasonal periods and in all the studied bacteria based on the concentrations (200, 100, 50, 25 mg/ml) prepared from the extracted mucus the average diameter of the growth zone diameter was increased with an increase in the extracted mucus concentration, and the Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, were the most sensitive and resistant bacteria to the extract, respectively. From the antibacterial investigations of the mucus on the standard strains based on the seasonal factor, the mucus obtained in the warm season period had higher antibacterial properties than the mucus obtained in the cold season period ( $p < 0.05$ ). The average diameter of the growth zone against the studied bacteria was greater in females than males, although it was not significantly different ( $p > 0.05$ ). The antibacterial effects of the fish mucus depended on the mucus concentrations (200, 100, 50, 25 mg/ml) and also, the amount of mucus secretion was significantly affected by seasonal changes and gender.

**Keywords:** Antibiotic resistance, Natural products, Mudskipper, Persian Gulf

---

\*Corresponding author