

Investigation on the Antibacterial Features of Mucus in *Boleophthalmus dussumieri* Mudskeeper

بررسی خاصیت ضدباکتریایی موکوس در *Boleophthalmus dussumieri* (Valenciennes, 1837) گلخورک ماهی

Azam Makipour^{1*}, Ashraf Jazayeri², Esmail Darabpour³

1. M.A., Animal biology-Biosystematics, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan, Iran.

2. Assistant Professor, Sea Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan, Iran.

3. Assistant Professor, Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan, Iran.

اعظم مکی‌پور^{۱*}، اشرف جزایری^۲، اسماعیل داراب‌پور^۳

۱. کارشناس ارشد، زیست جانوری - بیوسیستماتیک، گروه زیست‌شناسی،

دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، خوزستان، ایران.

۲. استادیار، زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه

شهید چمران اهواز، اهواز، خوزستان، ایران.

۳. استادیار، میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه

شهید چمران اهواز، اهواز، خوزستان، ایران.

(Received: Sep. 02, 2022- Accepted: Mar. 19, 2023)

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸)

Abstract

Due to the difference in the quality and quantity of proteins and enzymes in the mucus of different types of fish, therefore they have different antibacterial activity. *Boleophthalmus dussumieri* fish is one of the mudskeeper's species that has been reported from Musa Estuary according to previous studies. Therefore, the aim of this research is to investigate the antibacterial effect of *B. dussumieri* fish mucus against 3 standard bacterial strains (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Acinetobacter baumannii* (ATCC BAA-747), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)) and 3 clinical bacterial strains (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus anthracis*). After preparing the aqueous extract of mucus, its antibacterial effect was investigated in four concentrations of 25, 50, 100 and 200 mg/ml by disc diffusion method. Data were analyzed using SPSS 21 software and one-way ANOVA. The results showed that all the bacteria were sensitive to the mucus extract and there was a significant difference ($P < 0.05$) in the growth inhibition zone between different bacteria. It was also found that Gram-positive bacteria with an average non-growth zone of 12 mm showed more sensitivity to *B. dussumieri* fish skin mucus extract than Gram-negative bacteria with an average non-growth zone of 9 mm. The results of this research showed that the skin mucus of *Boleophthalmus dussumieri* fish has antimicrobial effect and has the ability to remove pathogenic agents in laboratory conditions.

Keywords: Antimicrobial activity, *Boleophthalmus dussumieri*, Mudskeeper, Mucus, Musa Estuary.

چکیده

گونه‌های مختلف ماهی به علت اختلاف در کیفیت و کمیت پروتئین‌ها و آنزیم‌های موجود در موکوس دارای، فعالیت ضدباکتریایی متنوعی هستند. ماهی *Boleophthalmus dussumieri* یکی از گونه‌های گلخورک است که طبق مطالعات گذشته از خور موسی گزارش شده است. با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه فعالیت ضد میکروبی موکوس این گونه گزارش نشده است، بنابراین هدف این پژوهش بررسی اثر ضدباکتریایی موکوس ماهی *B. dussumieri* علیه سه سویه باکتری استاندارد (*Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Acinetobacter baumannii* (ATCC BAA-747) و سه سویه باکتری کلینیکی (*Bacillus subtilis* (ATCC 6633)) و سه سویه باکتری کلینیکی (*Escherichia coli*، *Acinetobacter baumannii*، *Bacillus anthracis*) بود. بعد از تهیه عصاره آبی موکوس، اثر ضدباکتریایی آن در چهار غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به روش انتشار دیسک بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۱ و آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تمامی باکتری‌ها نسبت به عصاره موکوس حساس بودند و هاله عدم رشد بین باکتری‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. همچنین مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت با میانگین هاله عدم رشد ۱۲ میلی‌متر نسبت به باکتری‌های گرم منفی با میانگین هاله عدم رشد ۹ میلی‌متر حساسیت بیشتری در برابر عصاره موکوس پوست ماهی *B. dussumieri* نشان دادند. نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که موکوس پوست ماهی *Boleophthalmus dussumieri* دارای اثر ضد میکروبی بوده و قابلیت حذف عامل‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی را دارد.

واژه‌های کلیدی: گلخورک، خور موسی، فعالیت ضد میکروبی،

موکوس، *Boleophthalmus dussumieri*.

* نویسنده مسئول: اعظم مکی‌پور

مقدمه

چهار نوع گلخورکی که در نواحی بین جزر و مد ساحلی و خورهای خلیج فارس و دریای عمان پراکنش دارند می‌توان به *B. dussumieri* اشاره کرد (Abdoli, 2017). جنس *Boleophthalmus* شامل شش گونه می‌باشد (جدول ۱)، که در خلیج فارس، دریای عمان، پاکستان و غرب هند پراکنش دارد (Vandana et al., 2022).

گلخورک ماهیان^۱ متعلق به زیرراسته گاوماهی‌واران^۲، خانواده گاوماهیان^۳ می‌باشند. زیرخانواده Oxudercinae با ۱۰ جنس و ۳۹ گونه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری پراکندگی داشته که ۳۲ گونه با چهار جنس از آن‌ها به گلخورک ماهیان معروف هستند (www.fishbase.se). گلخورک ماهیان شامل چهار جنس *Periophthalmus*، *Boleophthalmus*، *Periophthalmodon* و *Scartelaos* می‌باشند (Aguilar et al., 2000). گستره‌ی پراکنش گلخورک‌ها در جهان در مناطق جزر و مدی از ژاپن تا هند شرقی، جزایر جنوبی اقیانوس آرام در هند، آفریقای شرقی و استرالیا و همچنین جنگل‌های حرا از غرب آفریقا به سوی شرق تا پاپوآی^۴ گینه جدید است (Mohammadpour, 2002). در ایران پراکنش آن‌ها در پهنه‌های گلی مناطق گرمسیری و نواحی جزر و مدی محدوده خورهای استان خوزستان و جنگل‌های حرا در مناطق ساحلی هرمزگان گزارش شده است (Mohammadpour et al., 2009). این ماهی‌ها زیستگاه مشترکی با بسیاری از گونه‌های تجاری (میگو، انواع ماهی و غیره) دارند و از آنجایی‌که با ایجاد حفره در تخلخل رسوبات، افزایش عمق احیای رسوبات، احیای مواد آلی بستر و چرخش مواد مغذی در لایه زایا کف دریا نقش مؤثری دارند، بنابراین حضور آن‌ها در افزایش مواد مغذی در دسترس در شبکه غذایی خورها بسیار مهم است (Marpol Convention). پنج گونه از گلخورک‌ها از خلیج فارس تا بمبئی هند پراکنش دارند که شامل *Boleophthalmus dussumieri*، *Periophthalmus argentilineatus*، *Periophthalmus waltoni* و *Scartelaos histophorus* می‌باشند. از میان

جدول ۱. اسامی گونه‌های جنس *Boleophthalmus*

نام جنس و گونه	
1: <i>Boleophthalmus birdsong</i>	Murdy, 1989
2: <i>Boleophthalmus boddarti</i>	Pallas, 1770
3: <i>Boleophthalmus caeruleomaculatus</i>	McCulloch & Waite, 1918
4: <i>Boleophthalmus dussumier</i>	Valenciennes, 1837
5: <i>Boleophthalmus poti</i>	Polgar et al., 2013
6: <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	Linnaeus, 1758

بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر ارگانسیم‌های انگلی، مخاطرات جدی در شیلات هستند به‌همین دلیل مدیریت بیماری‌ها، یکی از مهم‌ترین عناصر برای موفق شدن صنعت شیلات است (Kumari et al., 2019). بروز و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجب ایجاد چالش‌های منحصربه‌فرد در علم پزشکی شده است. در نتیجه به تازگی مطالعات مختلفی با هدف شناسایی عوامل ضد میکروبی جدید برای غلبه بر این مشکلات انجام شده است. جالب است که از میان مواد طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی، موکوس ماهی، منبع خوبی از ترکیبات فعال زیستی برای اهداف بالینی مختلف است (Sahrai et al., 2017). ساختار پوست ماهیان برای انجام وظایف مختلف سازگاری یافته است و از همه مهم‌تر این‌که پوست به‌عنوان اولین سد دفاعی بدن ماهی در مقابل عوامل تهدیدکننده محیط خارجی، نقش مهمی در سلامت و بهداشت ماهیان ایفا می‌کند (Benson et al., 2001). لایه موکوسی بر روی سطح بدن ماهی، عملکردهایی مانند مقاومت به بیماری، تنفس، تنظیم اسمزی و یونی، حرکت، ارتباط، تغذیه و ساخت آشیانه انجام می‌دهد (Mohammadpour,

1. Oxudercinae
2. Gobioidaei
3. Gobiidae
4. Papua New Guinea

گونه‌های اسینتوباکتر، باکتری‌های گرم منفی، هوازی و غیرتخمیری هستند که معمولاً در طبیعت یافت می‌شوند. باکتری‌های این گروه سازگاری بسیار خوبی با محیط پیرامون خود دارند. تحمل فعالیت آبی کم، مقاومت به مواد ضد عفونی‌کننده مانند کلر هگزیدین و فنل‌ها، سازگاری در دماهای حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در نهایت مقاوم شدن در برابر چندین گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها، از جمله ویژگی‌های بارز این گروه از باکتری‌ها است (NM *et al.*, 2018). از بین ۲۲ گونه ثبت شده در این گروه از باکتری‌ها، اسینتوباکتر بومانی فراوان‌ترین گونه ثبت شده در موارد عفونت‌های بالینی در انسان معرفی شده است (Cho *et al.*, 2018). سرده باسیلوس شامل باکتری‌هایی است بزرگ و هوازی و گرم مثبت و میله‌ای که به شکل پشت سر هم قرار می‌گیرند. اغلب از اعضای این جنس نظیر باسیلوس سئوس و باسیلوس سوبتلیس به شکل ساپروفیت در خاک و آب و هوا و سبزیجات دیده می‌شوند. این ارگانیس‌ها قادر به ایجاد بیماری‌هایی هم‌چون سیاه‌زخم و اسهال و تهوع در انسان می‌باشد (Zhu *et al.*, 2014). اطلاعات در دسترس در مورد عملکرد ضد میکروبی موکوس اپیدرم، به تعداد محدودی گونه ماهی محدود است. ویژگی ضد میکروبی موکوس اپیدرمی در برابر پاتوژن‌ها در ابتدا در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اثبات شد. از طرفی مشخص شد که حذف موکوس اپیدرمی در گونه‌هایی مانند شیرین‌ماهی (*Plecoglossus altivelis*) و سپرماهی (*Scophthalmus maximus*) بعد از چالش با *Listonella anguillarum* موجب افزایش مرگ‌ومیر شد (Subramanian *et al.*, 2008). در این راستا، Austin *et al.* (1995) نیز نشان دادند که عصاره موکوسی به دست آمده از سطح قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Salmo gairdneri*) فعالیت ضدباکتریایی نشان داده است. براساس مطالعات Kumari *et al.* (2019) ترکیب و میزان ترشح

(2002). در واقع، محیط آبی دارای پاتوژن‌های مختلف است و لایه موکوسی سد فیزیکی را ایجاد می‌کند که اولین خط دفاعی است و نقش مهمی در ایمنی ذاتی ماهی ایفا می‌کند (Fuochi *et al.*, 2017). Lirio *et al.* (2019) بیان کرده‌اند که موکوس سطحی یا ماده لزج ماهی حاوی موادی مانند کرینوتوکسین‌ها (Crynotoxin)، کالمودولین (Calmodulin)، فرمون‌ها، انواعی از مواد ضدبیماری‌زا مانند اسیدهای چرب، ایمونوگلوبولین‌ها، اجزای کمپلمان، لکتین‌ها، لیزوزیم‌ها، آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین و سایر پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی است. گزارش‌های جدید نشان داده است که پپتیدهای ضد میکروبی^۱ و سایر پروتئین‌های مرتبط با ایمنی که در موکوس پوست ماهی یافت می‌شود، با مبارزه با عفونت‌های پاتوژنی، نقش حیاتی در بقای ماهی ایفا می‌کنند (Lee *et al.*, 2020). باکتری‌ها متداول‌ترین گروه میکروارگانیس‌های بیماری‌زا هستند که از طریق آبزیان و فرآورده‌های شیلاتی آلوده سبب بروز مسمومیت و عفونت در مصرف‌کنندگان می‌شوند. به موازات افزایش مصرف آبزیان، میزان بیماری‌های ناشی از مصرف این فرآورده‌ها در اثر آلودگی به عوامل بیماری‌زا نیز افزایش یافته است (Feldhusen *et al.*, 2000). باکتری اشیریشیاکالای یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که جزو فلور میکروبی طبیعی روده بزرگ جانداران خونگرم بوده و وجود این میکروارگانیس‌م در مواد غذایی نشانه بروز آلودگی مدفوعی به‌شمار می‌رود. این باکتری شایع‌ترین عامل شیوع اسهال و اختلالات معده‌ای روده‌ای در سراسر جهان محسوب می‌شود. تخمین زده می‌شود که باکتری اشیریشیاکالای علت بروز بیش از ۷۳۰۰۰ بیماری در سال بوده که ۸۵ درصد آن‌ها مربوط به مصرف مواد غذایی آلوده است (Dutta *et al.*, 2018).

1. Anti-Microbial Peptides (AMPs)

تور ساچوک انجام شد. تعداد ۷۰ عدد ماهی گلخورک جمع‌آوری و به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. با استفاده از ویژگی‌های مورفومتریک شناسایی نمونه‌ها انجام شد و مورد تأیید قرار گرفت، سپس اثر ضدباکتریایی موکوس پوست ماهی بررسی شد (Coad, 2010; Murdy, 1989).

مطالعه خواص ضد میکروبی موکوس پوست

جمع‌آوری موکوس پوست

در این مطالعه به منظور جمع‌آوری موکوس پوست ماهیان از روش Subramanian (2008) استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از جمع‌آوری نمونه موکوس، ماهی‌ها در معرض گرسنگی قرار داده شدند. سپس ماهی‌ها در محلول عصاره گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۲ دقیقه بی‌هوش شدند. برای به حداقل رساندن باکتری‌های متصل به سطح بدن و از بین رفتن سایر آلودگی‌ها، ماهی‌ها درون آب سرد و تمیز وارد شده و بلافاصله با کمک دستکش استریل به صورت انفرادی درون کیسه‌های زیپ‌پلاست حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. پس از ۳ دقیقه ماهیان از کیسه خارج و به مخزن‌های مربوطه منتقل شدند و محلول حاوی سدیم کلرید و موکوس به لوله‌های فالكون منتقل شد (Sahrai et al., 2017).

تهیه عصاره با رقت‌های مختلف

پس از جمع‌آوری محلول حاوی سدیم کلرید و موکوس در مرحله قبل، به منظور تهیه عصاره، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰rpm و به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس مایع رویی به دست‌آمده جمع‌آوری و در دمای اتاق خشک و با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شد. جهت حل کردن پودر به دست‌آمده و تهیه عصاره تام از آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد. در نهایت محلول به دست‌آمده با استفاده از فیلتر ۰/۲۲

موکوس از گونه‌ای به گونه دیگر متغیر بوده و مشاهده شده است که این میزان در پاسخ به تماس میکروبی یا به نوسانات محیطی مانند اسمولاریته و pH بالا تغییر می‌کند (Subramanian et al., 2008). از طرفی، پژوهش‌ها نشان داده است که موکوس دهان و پوست در خانواده گاوماهیان دارای خاصیت ضدباکتریایی است، به طوری که برخی از باکتری‌ها از جمله *Pseudomonas*، *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumoniae*، *aeruginosa*، *Lactobacillus*، *Klebsiella oxytoca* و *bulgaricus* به آن حساسیت نشان می‌دهند (Ravi, 2010). Vandan et al. (2022) یک انگل جدید به نام *Ellipsomyxa boleophthalmi* sp. nov. (Myxozoa: Ceratomyxidae) را بر روی گونه *Boleophthalmus dussumieri* موجود در آب‌های شور هند گزارش دادند. Solaimani et al. (2014) آلودگی انگلی گلخورک *Boleophthalmus dussumieri* در آب‌های ساحلی بندرعباس را بررسی کردند. Sinaei et al. (2014) هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای در آب دریای ساحلی، رسوبات سطحی و گلخورک *Boleophthalmus dussumieri* از مناطق ساحلی خلیج فارس را بررسی کردند.

با بررسی منابع موجود تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر ضدباکتریایی موکوس *B. dussumieri* انجام نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر ضدباکتریایی موکوس پوست این ماهی علیه چند پاتوژن استاندارد و کلینیکی است.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه در محدوده جزر و مدی در خور غنام واقع در شمال غرب خلیج فارس، محدوده‌ای با عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۲۲ دقیقه و ۲۶/۸ ثانیه و طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۳ دقیقه و ۲۹/۸ ثانیه واقع شده است. نمونه‌برداری با دست و گاهی نیز با

تحلیل قرار گرفتند. تمامی مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است.

نتایج

تنوع مشاهده شده در فعالیت ضد میکروبی در میان گونه های ماهی، به علت ترکیب متنوع موکوس ترشح شده است، چراکه سلول های تولیدکننده موکوس در لایه اپیدرمی و اپی تلیال، بین گونه های ماهی متفاوت هستند (Lee et al., 2020). علاوه بر این، مواد بیوشیمیایی موکوس، بسته به شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی مانند شوری، pH و مراحل رشد و بلوغ، متغیر هستند. از طرفی تغییر در مقدار ترشح موکوس بین گونه های ماهی، نقش مهمی در حساسیت ماهی نسبت به عفونت ایفا می کند (Subramanian et al., 2008). تغییر در فعالیت ضدباکتریایی موکوس می تواند به علت گونه های مختلف ماهی، زیستگاه های متفاوت، سطوح مختلف استرس باشد. علاوه بر این، ماهیان مختلف می توانند حساسیت متفاوتی نسبت به پاتوژن های یکسان یا متفاوت داشته باشند (Kumari et al., 2019). به منظور سنجش خاصیت ضدباکتریایی موکوس تهیه شده از پوست ماهی *dussumieri* *Boleophthalmus* آزمایشات بر روی شش سویه باکتری شامل باکتری های استاندارد (*Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) و *Acinetobacter baumannii* (ATCC BAA-747) و باکتری های کلینیکی *Escherichia coli*، *Acinetobacter baumannii* و *Bacillus anthracis*) انجام شد. که باکتری *E. coli* و *A. baumannii* نماینده باکتری های گرم منفی و باکتری *Bacillus* نماینده باکتری های گرم مثبت بودند.

بر اساس نتایج نشان داده شده در جدول ۲، هاله عدم رشد بین باکتری های مختلف دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بود، به طوری که باکتری *B. subtilis* با میانگین هاله عدم رشد ۱۶ میلی متر حساس ترین و

میکرون استریل شد و جهت بررسی اثر ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گرفت (Ravi et al., 2010).

بررسی قدرت ضدباکتریایی موکوس به روش انتشار در دیسک

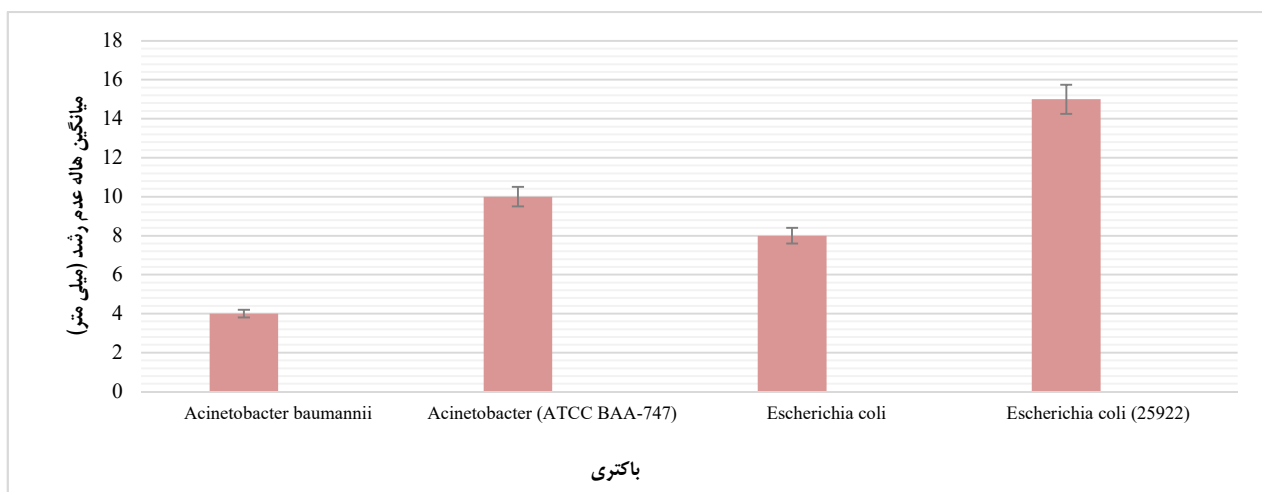
به منظور بررسی فعالیت ضدباکتریایی موکوس از روش انتشار دیسک استفاده شد (Bayer et al., 1996; Mangena et al., 1999). باکتری های مورد آزمایش شامل سویه های استاندارد و کلینیکی (*Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Acinetobacter baumannii* (ATCC BAA-747)، *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) و *Bacillus anthracis*) بودند که باکتری های *Escherichia coli* و *Acinetobacter baumannii* به عنوان نماینده باکتری های گرم منفی و باکتری های *Bacillus anthracis* و *Bacillus subtilis* به عنوان نماینده باکتری های گرم مثبت از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شدند. باکتری های مورد مطالعه ابتدا در محیط مولر هینتون برات کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۵ مک فارلند در محیط مولر هینتون برات تهیه شد. حدود ۰/۵ میلی لیتر از این مایع تلقیح اولیه توسط سواپ پنبه ای استریل به پلیت های حاوی محیط مولر هینتون آگار افزوده شد. در ادامه دیسک های بلانک استریل که به صورت جداگانه به غلظت های مختلف عصاره رقیق شده (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) آغشته شده بودند با فاصله بر روی محیط کشت قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر با خط کش اندازه گیری شد. این آزمایش برای هر سویه باکتری سه بار تکرار شد در نهایت داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و در سطح اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) مورد تجزیه و

پوست ماهی *B. dussumieri* نشان دادند. هم‌چنین در بین باکتری‌های گرم‌منفی، *E. coli* (ATCC25922) با میانگین هاله عدم رشد $15 \pm 0/41$ میلی‌متر حساس‌ترین باکتری و در بین باکتری‌های گرم مثبت، باکتری *B. subtilis* (ATTC 6633) با میانگین هاله عدم رشد $16 \pm 0/24$ میلی‌متر حساسیت بیشتری از خود نشان داد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

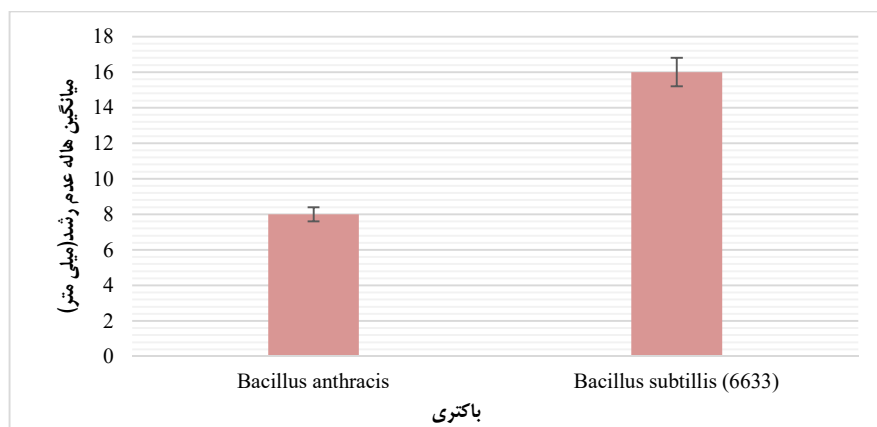
باکتری *A. baumannii* بالینی با میانگین هاله عدم رشد ۴ میلی‌متر، مقاوم‌ترین باکتری‌ها در برابر عصاره موکوس ماهی بودند. در این مرحله نتایج نشان داد که باکتری‌های گرم‌مثبت با میانگین هاله عدم رشد ۱۲ میلی‌متر نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی با میانگین هاله عدم رشد ۹ میلی‌متر حساسیت بیشتری در برابر عصاره موکوس

جدول ۲. جدول بررسی خاصیت ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره موکوس پوست ماهی *Boleophthalmus dussumieri*

غلظت				باکتری
۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	
Mean±SE				
19±0/333 ^b	16±0/667 ^c	13±0/333 ^d	10±0/333 ^{ef}	<i>Escherichia coli</i> (25922)
10±0/333 ^{efg}	8±0/333 ^{ghij}	8±0/00 ^{hig}	7±0/333 ^j	<i>Escherichia coli</i>
13±0/333 ^d	11±0/333 ^e	8±0/333 ^{ghij}	8±0/00 ^{hij}	<i>Acinetobacter</i>
9±0/333 ^{efgh}	8±0/333 ^{ghij}	0±0/00 ^k	0±0/00 ^k	<i>Acinetobacter baumannii</i>
21±0/333 ^d	17±0/333 ^c	14±0/00 ^d	13±0/333 ^d	<i>Bacillus subtilis</i>
9±0/00 ^{fghi}	9±0/333 ^{ghij}	8±0/00 ^{hij}	8±0/333 ^{ij}	<i>Bacillus anthracis</i>



شکل ۱. مقایسه خاصیت ضدباکتریایی در باکتری‌های گرم من



شکل ۲. مقایسه خاصیت ضدباکتریایی در باکتری‌های گرم مثبت



شکل ۳. مقایسه خاصیت ضدباکتریایی در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت

به‌عنوان نخستین سد دفاعی ماهی، به‌دلیل ترشح و جایگزینی مداوم مانع از تثبیت انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا بر روی سطوح خارجی بدن ماهی می‌گردد (Esteban, 2012). فاکتورهای ضد میکروبی از قبیل لایزوزیم، آلكالین فسفاتاز، آنزیم‌های پروبیوتیک و پروتئین‌های کمپلمان از مهم‌ترین عوامل ضد میکروبی موجود در موکوس هستند که قدرت ضدباکتریایی موکوس بیش‌تر به حضور این عوامل نسبت داده شده است (Lee et al., 2013).

همان‌طور که نشان داده شد در این مطالعه، عصاره موکوس پوست ماهی بررسی‌شده علیه باکتری‌های گرم‌مثبت، فعال‌تر از سویه‌های گرم‌منفی بود. در این راستا، Hellio et al. (2002) نیز اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آبی موکوس مربوط به ۱۳ گونه ماهی را بررسی کرده اما هیچ فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم‌مثبت *B. cereus*، *B. subtilis*، *S. aureus* و *Streptococcus sp.* باکتری‌های گرم‌منفی *Klebsiella*، *E. coli*، *Serratia marcescens pneumoniae*، *Proteus*، *Pseudomonas aeruginosa vulgaris* مشاهده نکردند. Kumari et al. (2019) نشان دادند که عصاره‌های آبی موکوس به‌دست‌آمده از *Rita rita* و *Channa punctatus*، هاله مهارتی تقریباً ۹/۷۵ میلی‌متر و ۸/۰۰ میلی‌متر را نسبت به *S. aureus* نشان

اثر ضدباکتریایی در تمام غلظت‌های بررسی‌شده عصاره دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بود و با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضدباکتری هم افزایش پیدا کرد.

نتایج آنالیز برای بررسی خاصیت ضدباکتریایی موکوس پوست ماهی *B. dussumieri* با توجه به دو عامل تعیین‌کننده، یعنی غلظت‌های مختلف عصاره و نوع باکتری نشان داد که بین این دو عامل اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($P < 0.001$). به این صورت که باکتری *Acinetobacter baumannii* با کم‌ترین میزان هاله عدم رشد (صفر) در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و باکتری *Bacillus subtilis* با بیش‌ترین هاله عدم رشد (۲۱ میلی‌متر) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به‌ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین باکتری بودند که تأییدکننده نتایج قبلی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

اپیتلیوم پوست جز اولین خطوط دفاعی ماهی در مقابل هجوم عوامل بیماری‌زا می‌باشد. اپیتلیال ماهی به وسیله لایه موکوسی که توسط سلول‌های گلابی شکل ترشح می‌شود، پوشیده می‌شود. لایه موکوسی متشکل از گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد که یک لایه دفاعی را بین ماهی و محیط خارجی ایجاد می‌کند موکوس پوست ماهیان

ضدباکتریایی خود تنوع نشان می‌دهند که می‌تواند به علت اختلاف در کیفیت و کمیت پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در موکوس ترشح‌شده باشد (Lawson et al., 2011). نتایج به دست آمده به وضوح نشان داد که موکوس به دست آمده از پوست ماهی *Bolephthalmus dussumieri* فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان می‌دهد که می‌تواند نقش مهمی در محافظت ماهی در برابر پاتوژن‌ها ایفا کند. پیشنهاد می‌شود تا عصاره‌های مختلف موکوس این گونه از گلخورک نیز مورد بررسی قرار گیرد تا شاید بتوان قدرت فعالیت این عصاره را تقویت کرد. از سوی دیگر مطابق با گزارش‌ها، این احتمال وجود دارد که فلور میکروبی در موکوس گونه‌های ماهی، عامل فعالیت ضد میکروبی مشاهده شده باشند، چراکه باکتری‌هایی مانند *Aeromonas hydrophila*، *salmonicida*، *Aeromonas*، *Pseudomonas fluorescens* و *Micrococcus luteus* در موکوس اپیدرمی برخی از گونه‌های ماهی تشخیص داده شده‌اند و مشاهده شده است که اجزای ضد میکروبی تولید می‌کنند. بنابراین مطالعات بیش‌تر برای تعیین منبع این فعالیت مورد نیاز است.

دادند. از طرفی این عصاره‌ها هیچ فعالیتی علیه *E. coli* و *P. aeruginosa* نداشتند و از نظر فعال‌تر بودن نسبت به باکتری‌های گرم‌مثبت با نتایج به دست آمده در این مطالعه همخوانی دارد. از سوی دیگر، Bragadeeswaran et al. (2011)، تأثیر ضدباکتریایی قوی از عصاره خام موکوس *Angullia* را گزارش کردند، به طوری که علیه *E. coli* و *P. aeruginosa* فعال بوده و هیچ فعالیتی علیه *K. pneumonia* نشان ندادند. در مطالعه Mahadevan et al. (2019) عصاره‌های موکوس مربوط به گلخورک *Periophthalmodon schlosseri* علیه باکتری‌های پاتوژن انسانی (شامل *S. E. coli*، *P. aeruginosa*، *Proteus mirabilis*، *Vibrio cholerae*، *Salmonella typhi*، *aureus* و *B. anthracis*) و سویه‌های قارچی مختلف (شامل *Candida albicans*، *Aspergillus flavus*، *Mucor* sp. و *Trichoderma longibriachtin*) فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. با توجه به این یافته‌ها مشخص است که گونه‌های مختلف ماهی، از نظر فعالیت

REFERENCES

- Abdoli, L. (2017). A comparative study of some biological characteristics of the flounder fish in the coasts of Hormozgan and Bushehr provinces. Master's thesis, Faculty of Basic Sciences; Hormozgan University. (in Persian)
- Agorreta, A.; San Mauro, D.; Schliewen, U.; Van Tassell, J. L.; Kovačić, M.; Zardoya, R.; & Rüber, L. (2013). Molecular phylogenetics of Gobioidae and phylogenetic placement of European gobies. *Molecular phylogenetics and evolution*; 69(3): 619-633.
- Aguilar, N. (2000). Comparative physiology of air breathing gobies. PhD thesis. Nature and Science School. University of California. San Diego. USA.
- Austin, B.; Stuckey, L. F.; Robertson, P. A. W.; Effendi, I.; & Griffith, D. R. W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*; 18(1): 93-96.
- Bayer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*; 45(4): 493-496.
- Benson, W.; & Schlenk, D. (2001). *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Volume 1-Organs*; Taylor & Francis.
- Bragadeeswaran, S.; Thangaraj, S. (2011). Hemolytic and antibacterial studies on skin mucus of eel fish, *Anguilla anguilla* Linnaeus. 1758. *Asian J Biol Sci*; 4(3): 272-276.

- Cho, G. S.; Li, B.; Rostalsky, A.; Fiedler, G.; Rösch, N.; Igbiosa, E.; Franz, C. M. (2018). Diversity and antibiotic susceptibility of Acinetobacter strains from milk powder produced in Germany. *Frontiers in microbiology*; 9, 536.
- Coad, B.C. (2010). Fresh water fish of Iraq. Canadian museum of nature, P.O.Box3443, station D, attuwa, Onatorio, Canada.
- Dutta, M.; Majumdar, P. R.; Rakeb-Ul-Islam, M. D.; Saha, D. (2018). Bacterial and fungal population assessment in smoked fish during storage period. *J Food Microbiol Saf Hyg*; 3(127): 2476-2059.
- Esteban, M. (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *International scholarly research notices*; 2012.
- Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and infection*; 2(13): 1651-1660.
- Fuochi, V.; Li Volti, G.; Camiolo, G.; Tiralongo, F.; Giallongo, C.; Distefano, A.; Tibullo, D. (2017). Antimicrobial and anti-proliferative effects of skin mucus derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). *Marine drugs*; 15(11): 342.
- Hassan Pourya, Salehi H.; A Study of the Legal Requirements for Pollution from Ships in the Sea of Oman and the Persian Gulf (Marpol Convention)
- Hellio, C.; Pons, A. M.; Beaupoil, C.; Bourgougnon, N.; Le Gal, Y. (2002). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 20(3): 214-219.
- Kumari, S.; Tyor, A. K.; & Bhatnagar, A. (2019). Evaluation of the antibacterial activity of skin mucus of three carp species. *International Aquatic Research*; 11(3): 225-239.
- Kumari, U.; Nigam, A. K.; Mital, S.; Mital, 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(7): 781-786.
- Larson, H. K.; Takita, T. (2004). Two new species of *Periophthalmus* (Teleostei: Gobiidae: Oxudercinae) from northern Australia, and a re-diagnosis of *Periophthalmus novaeguineensis*. *Beagle: Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory*; The, 20: 175-185.
- Lawson, E. O. (2011). Length-weight relationships and fecundity estimates in mudskipper, *Periophthalmus papilio* (Bloch and Schneider 1801) caught from the mangrove swamps of Lagos Lagoon, Nigeria. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*; 6(3): 264.
- Lee, J. S.; Cheng, H.; Damte, D.; Lee, S. J.; Kim, J. C.; Rhee, M. H.; Park, S. C. (2013). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Fish & shellfish immunology*; 34(3): 756-761.
- Lee, Y.; Bilung, L. M.; Sulaiman, B.; 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.
- Lirio, G.A.C.; Deleon, J.A.A.; Villafuerte, A.G. (2019). Antimicrobial activity of epidermal mucus from top aquaculture fish species against medically-important pathogens. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*; 16(5): 329-340.
- Mahadevan, G.; (2019). Biotic potential of mucus extracts of giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri* (Pallas, 1770) from Pichavaram, southeast coast of India. *The journal of basic and applied zoology*; 80(1): 1-7.

- Mangena, T.; Muyima, N. Y. O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in applied microbiology*; 28(4):291-296.
- Mohammadpour, J. (2002). Review of taxonomy, modification, classification and completion of the list of marine bony fish families (Persian Gulf and Gulf of Oman). Master thesis, Tarbiat Modares University. (in Persian)
- Mohammad Pour, Zainab Al-Sadat, Nabavi, Seyyed Mohammad Baqer, Dehghan Mediseh. (2009). Investigating the seasonal changes in the diet of *Periophthalmodon schlosseri*, based on the occurrence index, in the tidal beaches of Khor Smaili in Mahshahr. *Marine Biology*; 1(2): 92-102. (in Persian)
- Murdy, E. O. (1989). A taxonomic revision and cladistic analysis of the oxudercine gobies (Gobiidae: Oxudercinae).
- NM, S.; WF, A.; SM, M. (2018). Detection of *Acinetobacter* species in milk and some dairy products. *Assiut Veterinary Medical Journal*; 64(156): 34-40.
- Ravi, V.; Kesavan, K.; Sandhya, S.; Rajagopal, S. (2010). Antibacterial activity of the mucus of mudskipper *Boleophthalmus boddarti* (Pallas, 1770) from Vellar Estuary. *Advances in Environmental Sciences*; 2(1): 11-14.
- Sahrai, Zahiri, Fazel, Imanpour, Pir Ali Zafarei. (2017). Investigating the nutritional effects of black seed powder (*Nigella sativa*) on antibacterial activity and indicators of the mucus of *Kalame* fish (*Rutilus caspicus*). *Fisheries*; 69(4): 443-451. (in Persian)
- Sinaei, M.; Mashinchian, A. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the coastal sea water, the surface sediment and Mudskipper *Boleophthalmus dussumieri* from coastal areas of the Persian Gulf: source investigation, composition pattern and spatial distribution. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*; 12(1): 1-11.
- Solaimani, A.; Kamrani, E.; Zamanirad, M., & Kleinertz, S. (2014). Parasitic contamination of Mudskipper (*Boleophthalmus dussumieri*) in coastal waters of Banddar-Abbas. *Iranian Veterinary Journal*; 10(1): 68-76. (in Persian)
- Subramanian, S.; Ross, N. W.; MacKinnon, S. L. (2008). Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 150(1): 85-92.
- Vandana, V. R.; Poojary, N.; Tripathi, G.; Kumar, P.; Sanil, N. K.; Rajendran, K. V. (2022). Hepatic microsporidiosis of mudskipper, *Boleophthalmus dussumieri* Valenciennes, 1837 (Perciformes: Gobiidae), due to *Microgemma* sp. *Journal of Parasitic Diseases*; 46(1): 72-81.
- Zhu, F.; Cai, J.; Zheng, Q.; Zhu, X.; Cen, P.; & Xu, Z. (2014). A novel approach for poly- γ -glutamic acid production using xylose and corncob fibres hydrolysate in *Bacillus subtilis* HB-1. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*; 89(4): 616-622.
- <https://www.fishbase.se/search.php>