

Determining the Protective Effect of Epidermal Mucus in Some Persian Gulf Fishes against Pathogens

Fatemeh Gol Doost Bas ¹, Narges Amrollahi Biuki ^{1,2*}, Soolmaz Soleimani ¹, Morteza Yousefzadi ^{1,3}

¹Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

² Department of Modern Technologies, Mangrove Forest Research center, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

³ Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

Received: 7 May 2021 Accepted: 2 July 2021

Abstract

Background and Aim: Due to the increasing bacterial resistance to antibiotics and side effects of chemical drugs, the tendency to use natural resources has increased. The aim of this study was to investigate the antibacterial and antifungal activity of epidermal mucus in some fish of the Persian Gulf.

Methods: In the present laboratory study, mucus of 4 species of *Netuma bilineata*, *Solea elongata*, *Uryglossa orientalis* and *Muraenesox cinereus* were collected according to Ross (2000) method. The antibacterial and antifungal activity was evaluated by disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC).

Results: The antibacterial activity of ethyl acetate extract of mucus of 4 species of fish had more growth inhibitory effects against gram-negative bacteria than gram-positive bacteria, while the aqueous extract had no ability to inhibit the growth of gram-negative and gram-positive bacteria. In antifungal activity, the aqueous extract showed more growth inhibitory effects than ethyl acetate extract of mucus of 4 species of fish.

Conclusion: The results of this study can be promising for the use of fish mucus as a rich source for finding new antibacterial peptides for use in aquaculture and medicine.

Keywords: Antibacterial capacity, Antifungal capacity, Fish skin mucus, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Persian Gulf.

*Corresponding author: Narges Amrollahi Biuki, Email: amrollahi@hormozgan.ac.ir

Address: Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

تعیین تاثیر حفاظتی موکوس اپیدرمی برخی ماهیان خلیج فارس در مقابل عوامل بیماری‌زا

فاطمه گل دوست‌بس^۱، نرگس امراللهی بیوکی^{۱*}، سولماز سلیمانی^۱، مرتضی یوسف‌زادی^{۱،۳}

^۱ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
^۲ گروه فناوریهای نوین، پژوهشکده منطقه‌ای جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۴/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به افزایش روزافزون مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، گرایش به استفاده از منابع طبیعی افزایش یافته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی موکوس اپیدرمی برخی ماهیان خلیج فارس بود.

روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی حاضر، موکوس ۴ گونه ماهی *Euryglossa orientalis*، *Solea elongata*، *Netuma bilineata* و *Muraenesox cinereus* بر اساس روش Ross (۲۰۰۰) جمع‌آوری شد. فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی آن با روش انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتیل استاتی موکوس ۴ گونه ماهی در مقابل باکتری‌های گرم منفی توانایی مهار رشد بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت نشان داد، در حالی که عصاره آبی هیچ گونه توانایی در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی و مثبت نداشت. در فعالیت ضدقارچی عصاره آبی موکوس ۴ گونه ماهی توانایی بیشتری در مهار رشد قارچ‌ها نشان داد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند نویدبخش استفاده از موکوس ماهیان به‌عنوان یک منبع غنی برای یافتن پپتیدهای ضدباکتریایی جدید جهت کاربرد در آبی‌پروری و پزشکی باشد.

کلیدواژه‌ها: ظرفیت ضدباکتریایی، ظرفیت ضدقارچی، موکوس پوستی ماهی، حداقل غلظت کشندگی، خلیج فارس.

*نویسنده مسئول: نرگس امراللهی بیوکی. پست الکترونیک: amrollahi@hormozgan.ac.ir

آدرس: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

مقدمه

به دلیل استفاده گسترده و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط انسان، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ویروسی، کامل نکردن دوره درمانی آنتی‌بیوتیکی، استفاده از رژیم‌های درمانی تک دارویی به جای چند دارویی، فقدان تست‌های تشخیصی سریع جهت تعیین عفونت و استفاده نابه‌جا آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی یا پروفیلاکسی (prophylaxis) در صنعت دامپروری (صنعت پرورش آبزیان، دامداری) و کشاورزی، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به سرعت افزایش یافته است (۱،۲). این وضعیت به ویژه در کشورهای در حال توسعه، برای جلوگیری از بیماری‌های باکتریایی اتفاق می‌افتد. سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۹، یافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید را یک فوریت عمومی اعلام کرد. پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ میلادی، نرخ مرگ‌ومیر جهانی ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر از تلفات ناشی از سرطان شود. از این‌رو، یافتن عوامل ضدباکتریایی جایگزین ضروری است (۳).

پپتیدهای ضدباکتریایی؛ پپتیدهای کوتاه زنجیره با بار مثبت و آگریزی هستند که در طیف وسیعی از موجودات یافت می‌شود. این پپتیدها در سلول‌های میلوئیدی شامل نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و بافت مخاطی از جمله پوست، آبشش، روده و مجاری تنفسی مهره‌داران و بی‌مهرگان یافت می‌شوند و به عنوان یک گروه جدید از آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شده‌اند (۴). با وجود اینکه هیچ دارویی مبتنی بر پپتیدهای ضدباکتریایی در بازار وجود ندارد، عمل انتخابی، ویژگی ضدباکتریایی طبیعی و ظرفیت ناچیز پپتیدهای ضدباکتریایی در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها را به عنوان یک منبع بالقوه برای کاربردهای پزشکی در قالب آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی معرفی کرده است (۵).

پوست ماهی به عنوان نخستین سد دفاعی بدن در برابر انواع تنش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی مطرح است. موکوس اپیدرم در ماهیان شامل ترکیبات فعال زیستی متنوعی مثل لیزوزیم، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاوآنزیم‌ها، ایمونوگلوبین‌ها و پپتیدهای ضدباکتریایی است. ترشحات موکوسی نه تنها با به دام انداختن

غلظت بالای ترکیبات سمی مانع ورود آنها به بدن ماهی می‌گردند، بلکه پروتئین‌های ایمنی ذاتی مانند لیزوزیم و ایمونوگلوبین M از طریق موکوس با عوامل بیماری‌زا مقابله می‌نمایند (۶،۷). ماهی‌ها متنوع‌ترین گروه مهره‌داران محسوب می‌شوند که هر کدام پپتیدهای ضدباکتریایی با ساختارهای متفاوتی ترشح می‌کنند. همچنین، ترکیب موکوس در بین گونه‌های ماهی متفاوت است و این تفاوت به عوامل مختلفی از جمله مرحله رشد، جنسیت، جیره غذایی، عوامل فیزیوشیمیایی (شوری، pH و دما)، محرک‌های سیستم ایمنی، عفونت‌ها و استرس بستگی دارد (۸). از این‌رو، موکوس ماهیان یک منبع غنی برای یافتن پپتیدهای ضدباکتریایی جدید برای کاربرد در آبی‌پروری و پزشکی است.

از آنجایی که نقش حفاظتی موکوس اپیدرمی ماهیان سال‌های زیادی است که شناخته شده است و به صورت پیوسته و القایی برای محافظت ماهی در مقابل عوامل بیماری‌زا تولید می‌شود، می‌توان بیان کرد که موکوس اپیدرمی ماهی منبع غنی از پپتیدهای ضدباکتریایی محسوب می‌شود (۹). گربه ماهیان ساکن آب‌های ساحلی‌اند و در مصب‌ها بر روی فلات قاره نیز زندگی می‌کنند. کفشک ماهیان در آب‌های شور و حتی شیرین یافت می‌شوند و انواعی دیگر در اعماق اقیانوس‌ها به سر می‌برند. آن‌ها ماهیانی کفزی و گوشت‌خوار بوده و گونه‌های زیادی از آنها با طعم عالی و ارزش اقتصادی هستند. از این‌رو، هدف از این مطالعه تعیین فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی ۴ گونه ماهی *Netuma bilineata*، *Euryglossa orientalis*، *Solea elongata* و *Muraenesox cinereus* خلیج فارس بود که دارای بیشترین میزان موکوس در بین ماهیان این منطقه هستند.

روش‌ها

نمونه‌برداری: ۴ گونه ماهی آب شور در زمستان ۱۳۹۶ در استان هرمزگان، بندرعباس با ویژگی‌های ذکر شده در جدول ۱- به صورت تصادفی به کمک صیادان بومی از آب‌های خلیج فارس صید شد. ماهیان مورد مطالعه به کمک کلید شناسایی معتبر شناسایی شدند (۱۰،۱۱).

جدول ۱- ویژگی‌ها و نحوه صید ماهیان مورد مطالعه

نام	خانواده	نام علمی	تعداد نمونه صید شده	میانگین طولی (سانتی‌متر)	میانگین وزنی (گرم)	نحوه صید
گربه ماهی	Ariidae	<i>Netuma bilineata</i>	۲۰	$15/14 \pm 1/24$	$25/19 \pm 3/36$	تور گوش‌گیر و ترال
کفشک ماهی	Solidae	<i>Solea elongata</i>	۲۰	$10/67 \pm 2/94$	$13/74 \pm 3/86$	تور گوش‌گیر و ترال
کفشک ماهی	Solidae	<i>Euryglossa orientalis</i>	۲۰	$26/34 \pm 1/89$	$31/67 \pm 4/15$	تور گوش‌گیر و ترال
مارماهی	Muraenesocidae	<i>Muraenesox cinereus</i>	۷	$10/7/28 \pm 6/89$	$23/84/10 \pm 6/16$	گرگور

مقادیر میانگین طولی و وزنی براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است.

نگهداری شدند (۱۵).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی: برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارنده (MIC) باکتری‌ها و رشد قارچی توسط موکوس ماهیان (*Muraenesox*, *Solea elongata*, *Netuma bilineata* و *cinereus* و *Euryglossa orientalis*)، از لوله‌های آزمایش به شکل رقت سریال ۶ تایی استفاده شد. به‌طوری که نهایتاً در هر لوله، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به همراه حجم‌های مناسب عصاره‌ها (۳۱/۲۵ - ۱۰۰۰) وجود داشته باشد. استوک تهیه شده باکتری (دارای غلظت برابر با استاندارد نیم مک فارلند) با استفاده از محیط کشت مایع، ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. سپس یک میلی‌لیتر به تمام لوله‌ها به استثنای لوله‌های کنترل اضافه گردید. در مرحله آخر، لوله‌ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارندگی رشد، اولین لوله‌ای که کدورتی ندارد و به بیان دیگر، رشد باکتری و قارچ در آن مشاهده نمی‌شود، به‌عنوان عدد MIC منظور می‌شود (۱۶). تعیین حداقل غلظت بازدارندگی تنها برای نمونه‌هایی که در روش انتشار دیسک هاله عدم رشد در آن‌ها مشاهده شد، صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج آزمون حساسیت به روش انتشار دیسک در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های آلی موکوس ماهیان در جدول ۲- آمده است. از بین همه نمونه‌های مورد آزمایش فقط عصاره ایتیل استاتی *N. bilineata* و *E. orientalis* فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند. عصاره ایتیل استاتی *E. orientalis* با بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در مقابل باکتری گرم منفی *K. pneumoniae* و *E. coli* فعالیت متوسطی را نشان داد. کمترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط به عصاره ایتیل استاتی *E. orientalis* در مقابل باکتری گرم مثبت *B. cereus* بود. همه عصاره‌ها فعالیت ضدباکتریایی ضعیف‌تری نسبت به آمپی‌سیلین بعنوان کنترل مثبت نشان دادند. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری‌های مورد مطالعه در جدول ۳- آمده است. در این آزمون فقط عصاره‌های ایتیل استاتی *N. bilineata* و *E. orientalis* که توانایی مهار رشد باکتری در روش انتشار دیسک را نشان دادند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره ایتیل استاتی *N. bilineata* نسبت به عصاره ایتیل استاتی *E. orientalis* در غلظت‌های پایین‌تری رشد باکتری‌ها را مهار کرد. عصاره‌های ایتیل استاتی *N. bilineata* و *E. orientalis* نسبت به باکتری‌های گرم منفی (*E. coli* و *V. alginolyticus*) توانایی مهار بیشتری از خود نشان دادند.

اثرات ضدقارچی عصاره‌های آبی و ایتیل استاتی موکوس ماهیان *Muraenesox*, *Solea elongata*, *Netuma bilineata* و *cinereus* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی ۳ سویه قارچی بررسی شد. عصاره آبی موکوس ماهیان نسبت به عصاره ایتیل استاتی توانایی بیشتری در مهار رشد

جمع‌آوری موکوس پوست: جمع‌آوری موکوس براساس روش Ross (۲۰۰۰) انجام شد. ماهیان پس از بیهوشی با ۵ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به‌صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفته و پس از ۲ دقیقه ماهی‌ها از کیسه‌ها خارج شدند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و فاز رویی به‌وسیله انجماد سخت خشک گردید (۱۲). موکوس پودر شده با اتانول ۹۵ درصد با نسبت ۱ به ۳ مخلوط شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ و فاز رویی به کمک دستگاه روتاری تغلیظ و به کمک دستگاه فریزدرایر کاملاً خشک شد. در مرحله بعد، پودر خشک شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال ایتیل استات به محلول اضافه گردید. در آخر دو فاز آبی و ایتیل استاتی از هم جدا و جهت بررسی‌های پتانسیل زیستی در فریزر ذخیره شدند (۱۳).

فعالیت ضدباکتریایی

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد با روش انتشار دیسک: فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های ایتیل استاتی و آبی با روش انتشار دیسک انجام شد. سویه‌های باکتریایی گرم مثبت *Micrococcus aureus* (ATCC ۹۳۴۱) و *Staphylococcus aureus* (ATCC ۲۵۹۲۳) و گرم منفی *Vibrio alginolyticus* (ATCC ۱۷۷۴۹) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC ۲۷۹۵۶) و *Escherichia coli* (ATCC ۲۵۹۲۲) و *Bacillus cereus* و *Klebsiella pneumoniae* از مؤسسه پاستور تهران تهیه شدند. به‌طور خلاصه، بعد از کشت فعال باکتری‌ها، برای رشد آنها در محیط کشت نوترینت براث در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴ ساعت انکوبه شد تا به غلظت نیم مک‌فارلند برسد. سپس، باکتری‌ها به کمک سوآپ استریل روی سطح پلیت‌های محتوی آگار کشیده شد. دیسک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر بر روی پلیت‌ها قرار گرفتند و ۲۰ میکرولیتر از هر یک از فراکشن‌ها با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی دیسک‌ها (سه بار تکرار) تزریق شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله مهار رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری گردید (۱۴).

فعالیت ضدقارچی

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد با روش انتشار دیسک: فعالیت ضدقارچی عصاره‌های ایتیل استاتی و آبی با روش انتشار دیسک انجام شد. سویه‌های قارچ‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* و *Candida albicans* تهیه شدند. به‌طور خلاصه، قارچ‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت دکستروز آگار به صورت چمنی کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط آزمایشگاه) به مدت ۸ روز نگهداری شدند تا قارچ‌ها به خوبی رشد کرده و اسپور تشکیل دادند. اسپورها با آب مقطر استریل از روی محیط کشت جمع‌آوری و در دمای یخچال

مطالعه در جدول ۵- آمده است. در این آزمون فقط عصاره‌هایی که توانایی مهار رشد قارچ در روش انتشار دیسک را نشان دادند، مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، کمترین غلظت بازدارندگی رشد قارچ مربوط به عصاره آبی *N. bilineata* در مقابل *S. cerevisiae* و عصاره آبی *E. orientalis* در مقابل *C. albicans* بود.

سویه‌های قارچی دارند. از بین همه نمونه‌های مورد مطالعه عصاره آبی *N. bilineata* و *E. orientalis* فعالیت ضدقارچی بالایی به ترتیب در مقابل *S. cerevisiae* و *C. albicans* را نشان دادند (جدول ۴-).
نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد سویه قارچ‌های مورد

جدول ۲- مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره‌های آلی موکوس ماهیان بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

نمونه میکروارگانیسم	<i>N. bilineata</i>		<i>S. elongata</i>		<i>E. orientalis</i>		<i>M. cinereus</i>		آمی سیلین*
	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی	
<i>B. cereus</i>	۷/۷ ± ۰/۱	-	-	-	۶/۳ ± ۰/۲	-	-	-	۱۴/۰ ± ۰/۵
<i>S. aureus</i>	۸/۱ ± ۰/۱	-	-	-	۹/۳ ± ۰/۱	-	-	-	۱۳/۰ ± ۰/۴
<i>M. luteus</i>	۸/۰ ± ۰/۲	-	-	-	۹/۰ ± ۰/۱	-	-	-	۱۱/۰ ± ۰/۳
<i>E. coli</i>	۷/۰ ± ۰/۱	-	-	-	۱۰/۰ ± ۰/۲	-	-	-	۱۲/۰ ± ۰/۵
<i>V. alginolyticus</i>	۹/۰ ± ۰/۱	-	-	-	۹/۲ ± ۰/۱	-	-	-	۱۳/۰ ± ۰/۴
<i>K. pneumoniae</i>	۸/۲ ± ۰/۱	-	-	-	۱۰/۰ ± ۰/۲	-	-	-	۱۲/۰ ± ۰/۳
<i>P. aeruginosa</i>	۸/۵ ± ۰/۲	-	-	-	-	-	-	-	۱۰ ± ۰/۶

عدم فعالیت (-)، فعالیت متوسط (۱۴-۷)، فعالیت بالا (>۱۴). قطر هاله عدم رشد شامل قطر دیسک (۶ میلی‌متر) است. واحد اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد میلی‌متر است. اعداد به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شد. * آنتی‌بیوتیک آمی‌سیلین (بعنوان کنترل) با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر دیسک مورد آزمون قرار گرفت.

جدول ۳- مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتیل استاتی گربه ماهی و کفشک ماهی بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

نمونه میکروارگانیسم	<i>N. bilineata</i>	<i>E. orientalis</i>
	اتیل استاتی	اتیل استاتی
<i>B. cereus</i>	-	-
<i>S. aureus</i>	۵	-
<i>M. luteus</i>	-	-
<i>E. coli</i>	۵	۱۰
<i>V. alginolyticus</i>	۵	۱۰
<i>K. pneumoniae</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-

حداقل غلظت بازدارندگی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

جدول ۴- مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره‌های آلی موکوس ماهیان بر روی قارچ‌های مورد مطالعه

نمونه سویه قارچ‌ها	<i>N. bilineata</i>		<i>S. elongata</i>		<i>E. orientalis</i>		<i>M. cinereus</i>	
	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی
<i>S. cerevisiae</i>	-	۱۵/۲ ± ۰/۲	۱۱/۳ ± ۰/۱	۱۳/۰ ± ۰/۲	-	۱۴/۶ ± ۰/۲	-	۹/۳ ± ۰/۱
<i>C. albicans</i>	-	۱۱/۰ ± ۰/۱	۱۰/۰ ± ۰/۲	۱۰/۶ ± ۰/۲	-	۱۷/۵ ± ۰/۱	-	-

عدم فعالیت (-)، فعالیت متوسط (۱۴-۷)، فعالیت بالا (>۱۴). قطر هاله عدم رشد شامل قطر دیسک (۶ میلی‌متر) است. واحد اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد میلی‌متر است. اعداد به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است.

جدول ۵- مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آلی موکوس ماهیان بر روی قارچ‌های مورد مطالعه

نمونه سویه قارچ‌ها	<i>N. bilineata</i>		<i>S. elongata</i>		<i>E. orientalis</i>		<i>M. cinereus</i>	
	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی	اتیل استاتی	آبی
<i>S. cerevisiae</i>	-	۵	۱۰	۱۰	-	۱۰	-	>۱۰
<i>C. albicans</i>	-	۱۰	>۱۰	>۱۰	-	۵	-	-

حداقل غلظت بازدارندگی بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

بحث

منابع دارویی شیمیایی دارای اثرات جانبی و پایداری در محیط زیست هستند. برای غلبه بر این مشکل، مطالعات بسیاری به منظور استفاده از منابع طبیعی و امن تر انجام شده است. جانوران یک منبع دارویی برای بسیاری از بیماری‌های مختلف انسانی هستند. موجودات چند سلولی منبع بسیار خوبی از ترکیبات طبیعی هستند که در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها، تک یاخته‌ها و ویروس‌ها فعالیت دارند (۱۷). تاکنون چند ترکیب با فعالیت ضدباکتریایی از ماهی به خصوص از پوست و موکوس روی پوست ماهی گزارش شده است. از این‌رو، موکوس ماهی دارای ترکیباتی است که می‌تواند در فرمولاسیون داروهای جدید برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد (۲۱-۱۸).

مطالعات مختلف نقش حفاظتی موکوس و ترکیبات آن در گونه‌های مختلف ماهی نشان می‌دهد که موکوس اپیدرمی به عنوان خط اول دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند. تاکنون موکوس اپیدرمی ماهیان مختلف برای تعیین ترکیبات ضدباکتریایی آزمایش شده است (۲۰، ۲۲-۲۴) و اطلاعات کمی در مورد فعالیت ضدباکتریایی گونه‌های گربه ماهی در دسترس است (۲۲، ۲۵). Gobinath فعالیت ضدباکتریایی دو گونه گربه ماهی *Arius maculatus* و *Mystus gulio* را بررسی کردند (۲۶)، نتایج آن‌ها نشان داد که موکوس این ماهی‌ها توانایی بیشتری در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارد. همچنین Patel و همکاران و Fu و همکاران بیان کردند که عصاره‌های استخراج شده با حلال‌های نیمه قطبی از جمله اتیل استات فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را نسبت به سایر حلال‌ها نشان می‌دهد (۲۷، ۲۰). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که عصاره اتیل استاتی موکوس ماهیان مورد مطالعه دارای توانایی ضدباکتریایی بیشتری نسبت به عصاره آبی هستند. سلول‌های تولیدکننده موکوس در لایه اپیدرم و اپیتلیال بین گونه‌های ماهی متفاوت است و در نتیجه می‌توان سلول‌های مخاط را تحت تاثیر قرار دهد. علاوه بر این ترکیبات موکوس در شرایط زیست محیطی و فیزیولوژیکی متفاوت مانند شوری، pH محلول، استرس و شرایط رشد و بلوغ متفاوت است. تغییر در میزان ترشح موکوس بین گونه‌های ماهی، نقش مهمی در مستعد بودن ماهی به عفونت دارد (۲۸). همچنین در این لایه‌ها بسیاری از آنزیم‌ها و پروتئین‌های ضدباکتریایی وجود دارد که تصور می‌شود در ایمنی ذاتی ماهی نقش بسزایی دارند. تفاوت در آنزیم‌های ضدباکتریایی در بین ماهیان مانند لیزوزیم و پروتئازها و نحوه ارتباط آنها به ساختار و ترکیب مخاط و لایه‌های اپیدرمی مربوطه، ممکن است به مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌ها وابسته باشد (۱۷). از آنجا که شرایط اکولوژیک، فصل، میزان استرس محیطی و عوامل دیگر در محیط‌های آبی متفاوت است، دور از انتظار نیست که در فعالیت زیستی از جمله فعالیت

ضدباکتریایی گونه‌های مورد مطالعه و همچنین سایر گونه‌های خلیج فارس و دیگر پهنه‌های آبی تفاوت مشاهده شود.

در سال‌های اخیر، پروتئین‌های متفاوتی از گیاهان و جانوران استخراج شده که به عنوان مکانیسم دفاعی میزبان، موجب از بین رفتن باکتری‌های بیماری‌زا، قارچ‌ها و دیگر انگل‌ها می‌شود. به طور کلی فعالیت غیراختصاصی اما سریع در حمله میکروارگانیسم‌ها، دفاع کم هزینه‌تری است (۲۶). موکوس ماهی دارای پپتیدهایی است مانند پپتیدهای آمفی‌پاتیک مارپیچ آلفا، که با اتصال به سطح غشای میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها و غیره موجب از بین رفتن محتوای درون سلولی می‌شوند (۲۸). پژوهشگران زیادی پپتیدهای ضد میکروبی را از ترشحات اپیدرمی انواع ماهی‌ها جدا کرده‌اند، اما این میزان در برابر تعداد پپتیدهای شناسایی شده از ترشحات اپیدرمی دوزیستان و پستانداران ناچیز است (۴). جاذبه الکتروستاتیک بین پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی و سطح باکتری با بار منفی، عامل مهمی برای واکنش بین پپتیدها و غشای میکروبی هستند (۲۹). غشای سیتوپلاسمی هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت از فسفولیپیدهای اصلی با گروه‌های دارای بار منفی مانند فسفولیپیدهای فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل گلیسرول و کاردیولیپین تشکیل شده است و برای پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی بسیار مناسب است (۳۰، ۲۹). وجود اسیدهای تیکوئیک در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و لیپوپلی ساکارید در غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی، هر یک موجب افزایش بار منفی روی سطح باکتری‌ها می‌شوند (۳۱). براساس مطالعات متعدد، یک پپتید ضد میکروبی معین می‌تواند برای برخی باکتری‌ها کشنده محسوب شود و در عین حال روی برخی موثر نباشد و به عبارت دیگر، فعالیت ضدباکتریایی بالاتری را نسبت به یک نوع باکتری خاص به نمایش گذارد (۴). Reverter و همکاران، Kumari و همکاران، Tartor و همکاران و Tiralongo و همکاران تایید کردند که عصاره‌های استخراج شده از موکوس ماهیان با حلال آبی دارای فعالیت ضدقارچی بیشتری نسبت به سایر حلال‌ها است (۱۷، ۳۴-۳۲). از این‌رو، می‌توان بیان کرد که ترکیبات قطبی در موکوس ماهیان دارای فعالیت ضدقارچی است. نتایج مربوط به فعالیت ضدقارچی این مطالعه نیز نشان داد که عصاره آبی استخراج شده از موکوس ماهیان دارای فعالیت ضدقارچی قوی‌تری نسبت به عصاره اتیل استاتی است. در آخر می‌توان بیان کرد که موکوس ماهیان می‌تواند به عنوان یک منبع بالقوه از ترکیبات ضدباکتریایی و ضدقارچی جدید معرفی گردد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که موکوس ماهی *N. bilineata* به دلیل دارا بودن ترکیبات نیمه قطبی در غلظت پایین دارای فعالیت ضدباکتریایی بر روی سویه‌های گرم منفی *E. coli* و *V. alginolyticus* و گرم مثبت *S. aureus* است. موکوس *N.*

ایده پردازی، متدولوژی، ادیت مقاله، یوسف زادی: ادیت مقاله. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تشکر و قدردانی: از همه اساتیدی که در غنای مطالب حاضر یاری‌رسان بودند، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منفعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

E. orientalis و *bilineata* به دلیل دارا بودن ترکیبات قطبی در غلظت پایین دارای فعالیت ضدقارچی به ترتیب در مقابل *S. cerevisiae* و *C. albicans* است. نتایج به‌دست آمده می‌تواند نویدبخش استفاده از موکوس ماهیان به عنوان منبع طبیعی و ارزشمند جایگزین ترکیبات شیمیایی در محافظت پوستی در مقابل عفونت ناشی از حضور میکروارگانیسم‌ها برای کاربردهای پزشکی باشد.

نقش نویسندگان: گل‌دوست‌بس: کار آزمایشگاهی، سلیمانی: متدولوژی، آنالیز داده‌ها، نگارش مقاله، امراللهی بیوکی:

منابع

- Cabello FC, Godfrey HP, Buschmann AH, Dölz HJ. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. The Lancet Infectious Diseases. 2016; 16 (7): e127-e33. doi:10.1016/S1473-3099(16)00100-6
- Robinson TP, Wertheim HF, Kakkar M, Kariuki S, Bu D, Price LB. Animal production and antimicrobial resistance in the clinic. The Lancet. 2016;387 (10014): e1-e3. doi:10.1016/S0140-6736(15)00730-8
- Organization WH. 2019 antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 2019.
- Masso-Silva JA, Diamond G. Antimicrobial peptides from fish. Pharmaceuticals. 2014;7(3):265-310. doi:10.3390/ph7030265
- Rajanbabu V, Chen J-Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. Peptides. 2011;32(2):415-20. doi:10.1016/j.peptides.2010.11.005
- Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). Fish & shellfish immunology. 2006;20(2):137-51. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Shiry N, Khoshnoodifar K, Alavinia SJ. Cutaneous mucosal immune-parameters and intestinal immune-relevant genes expression in streptococcal-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A comparative study with the administration of florfenicol and olive leaf extract. Fish & Shellfish Immunology. 2020; 107: 403-10. doi:10.1016/j.fsi.2020.10.023
- Ángeles Esteban M. An overview of the immunological defenses in fish skin. International Scholarly Research Notices. 2012;6(2):236-31. doi:10.5402/2012/853470
- Park IY, Park CB, Kim MS, Kim SC. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. FEBS letters. 1998; 437 (3):258-62. doi:10.1016/S0014-5793(98)01238-1
- Carpenter KE, Krupp F, Jones DA. Living marine resources of Kuwait, Eastern Saudi Arabia, Bahrain, Qatar, and the United Arab Emirates: Food & Agriculture Org.; 1997.
- Coad W. Check list and bibliography of Persian Gulf fish. Available in: <http://sharkyear.com/2012/checklist-of-sharksof-the-persian-gulf.html>. 1992.
- Ross NW, Firth KJ, Wang A, Burka JF, Johnson SC. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection

- with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. Diseases of aquatic organisms. 2000;41(1):43-51. doi:10.3354/dao041043
- Subhashini S, Lavanya J, Jain S, Agihotri T. Screening of antibacterial and cytotoxic activity of extracts from epidermis and epidermal mucus of *Barbonymus schwanenfeldii* (Tinfoil barb fish). International Journal of Research in Engineering and Technology. 2013;2(04):492-7. doi:10.15623/ijret.2013.0204014
 - Karting T. Still. F and Reinthaler. F, antimicrobial activity of the essential oil of young pine shoots. Journal Ethnopharmacology. 1991;35:155-7. doi:10.1016/0378-8741(91)90067-N
 - Yassin MT, Mostafa AA, Al-Askar AA, Bdeer R. In vitro antifungal resistance profile of *Candida* strains isolated from Saudi women suffering from vulvovaginitis. European journal of medical research. 2020; 25(1):1-9. doi:10.1186/s40001-019-0399-0
 - Lyskova P, Hubka V, Svobodova L, Barrs V, Dhand NK, Yaguchi T, et al. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* complex: comparison of two in vitro methods. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2018;62(4):e01927-17. doi:10.1128/AAC.01927-17
 - Reverter M, Tapissier-Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P. Biological and ecological roles of external fish mucus: a review. Fishes. 2018;3(4):41-50. doi:10.3390/fishes3040041
 - Fuochi V, Li Volti G, Camiolo G, Tiralongo F, Giallongo C, Distefano A, et al. Antimicrobial and anti-proliferative effects of skin mucus derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). Marine drugs. 2017; 15(11):342. doi:10.3390/md15110342
 - Joseph R. isolation and partial purification of antibacterial compound in the mucus of the zebra fish *danio rerio*. Journal of Advanced Scientific Research. 2020; 11(1):37-42.
 - Patel M, Ashraf MS, Siddiqui AJ, Ashraf SA, Sachidanandan M, Snoussi M, et al. Profiling and role of bioactive molecules from *puntius sophore* (freshwater/brackish fish) skin mucus with its potent antibacterial, antiadhesion, and antibiofilm activities. Biomolecules. 2020;10(6):920. doi:10.3390/biom10060920
 - Uyan A, Turan C, Erdogan-Eliuz EA, Sangun MK. Antimicrobial properties of bioactive compounds isolated from epidermal mucus in two Ray species

- (*Dasyatis marmorata* and *Gymnura altavela*). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2020;19(10):2115-21. doi:10.4314/tjpr.v19i10.15
22. Abdel-Shafi S, Osman A, Al-Mohammadi A-R, Enan G, Kamal N, Sitohy M. Biochemical, biological characteristics and antibacterial activity of glycoprotein extracted from the epidermal mucus of African catfish (*Clarias gariepinus*). *International journal of biological macromolecules*. 2019;138:773-80. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.150
23. Taei HM, Hajimoradloo A, Hoseinifar SH, Ahmadvand H. Dietary Myrtle (*Myrtus communis* L.) improved non-specific immune parameters and bactericidal activity of skin mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish & shellfish immunology*. 2017;64:320-4. doi:10.1016/j.fsi.2017.03.034
24. Wang H, Tang W, Zhang R, Ding S. Analysis of enzyme activity, antibacterial activity, antiparasitic activity and physico-chemical stability of skin mucus derived from *Amphiprion clarkii*. *Fish & shellfish immunology*. 2019;86:653-61. doi:10.1016/j.fsi.2018.11.066
25. Li T, Liu Q, Wang D, Li J. Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. *Fish & shellfish immunology*. 2019;92:881-8. doi:10.1016/j.fsi.2019.07.015
26. Gobinath RAC, Ravichandran S. Antimicrobial peptide from the epidermal mucus of some estuarine cat fishes. *World App Sci J*. 2011;12:256-60.
27. Fu Y, Zhang Q, Xu D-H, Xia H, Cai X, Wang B, et al. Parasitocidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. *Diseases of aquatic organisms*. 2014;108(2):129-36. doi:10.3354/dao02708
28. Loganathan K, Muniyan M, Prakash AA, Raja PS, Prakash M. Studies on the role of mucus from *Clarias batrachus* (Linn) against selected microbes. *Int J Pharma Appl*. 2011;2:202-6.
29. Ebenhan T, Gheysens O, Kruger HG, Zeevaert JR, Sathekge MM. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed research international*. 2014; 3(1):1-15. doi:10.1155/2014/867381
30. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*. 2009;30(3):131-41. doi:10.1016/j.it.2008.12.003
31. Bazzaz BSF, Seyedi S, Goki NH, Khameneh B. Human Antimicrobial Peptides: Spectrum, Mode of Action and Resistance Mechanisms. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020;4(2):1-16.
32. Kumari S, Yadav S. Study of Antifungal Activity of Epidermal Mucus of Three Fresh Water Fishes. *Annals of Biology*. 2020;36(1):75-80.
33. Tartor Y, Taha M, Mahboub H, El Ghamery M. Yeast species associated with diseased fish: occurrence, identification, experimental challenges and antifungal susceptibility testing. *Aquaculture*. 2018;488:134-44. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.01.033
34. Tiralongo F, Messina G, Lombardo BM, Longhitano L, Li Volti G, Tibullo D. Skin Mucus of Marine Fish as a Source for the Development of Antimicrobial Agents. *Frontiers in Marine Science*. 2020;7:760 doi:10.3389/fmars.2020.541853