فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۳، پیاپی ۶۹، پاییز ۱۴۰۰، ص ۱۵۸-۱۷۵
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.3, Ser.69, Autumn 2021, p. 158-175
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۵

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.35769.1415

بررسی خواص ضد باکتریایی موکوس در گلخورک‌ماهی

(*Periophthalmus waltoni* koumans, 1941)

اعظم مکی‌پور[۱]، اشرف جزایری*[۲]، اسماعیل داراب‌پور[۳]

چکیده

امروزه ظهور و گسترش باکتریهای بیماریزای مقاوم به دارو به یک نگرانی جهانی بزرگ تبدیل شده است. بنابراین، یک نیاز فوری برای کشف داروهای ضدمیکروبی جدید وجود دارد. موکوس گلخورک ماهی می تواند یک منبع جدید و بکر برای ترکیبات ضدباکتریایی باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر ضدباکتریایی موکوس ماهی (*periophthalmus waltoni* Koumans,1941 *)، علیه برخی باکتریهای شاخص بیماریزا شامل* *Escherichia coli*، *Bacillus subtillis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* *بود. همچنین تاثیر فاکتورهای جنسیت و فصل نیز بر توانایی اثر ضدمیکروبی موکوس بررسی شد. بعد از تهیه عصاره آبی موکوس، اثر ضدباکتریایی آن به روش انتشار دیسک بررسی شد. همچنین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) موکوس علیه دو باکتری که حساسیت بیشتری نشان دادند تعیین شد. نتایج نشان داد که تمامی باکتریها نسبت به عصاره موکوس حساس بودند. باکتری* *Bacillus subtillis* *و باکتری* *Pseudomonas aeruginosa* *به ترتیب حساس ترین و مقاوم ترین باکتری نسبت به عصاره موکوس مورد آزمایش بودند جنسیت ماهی تفاوت معناداری در خاصیت ضدمیکروبی موکوس ایجاد نکرد ولی ماهی ماده به صورت جزئی فعالیت ضدباکتریایی بالاتری از خود نشان داد*($P>0/001$). *همچنین مشخص شد موکوس بدست آمده از ماهی در فصل بهار خاصیت ضد باکتریایی بالاتری نسبت به موکوس بدست آمده از ماهی در فصل پاییز دارد*($P<0/001$).

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، ماهی ، موکوس، Periophthalmus waltoni

۱- کارشناس ارشد، زیست جانوری- بیوسیستماتیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اهواز، خوزستان، ایران.
۲- استادیار، زیست‌شناسی دریا، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی ، اهواز، خوزستان، ایران.
*(نویسنده مسئول: A.jazayeri@scu.ac.ir)
۳- استادیار، میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اهواز، خوزستان، ایران.

مقدمه

ماهیان باله شعاعی، بیشتر ماهیان شناخته شده و استخوانی امروزی از جمله گل‌خورک‌ها را شامل می‌شوند (دانشفر، ۱۳۸۸؛ Hickman *et al.*, 2001). گل‌خورک‌ها متعلق به زیر راسته‌ی Gobioidei، خانواده‌ی گاوماهیان(Gobiidae) و زیرخانواده‌ی oxudercinae هستند. چهار جنس گلخورک‌ماهیان عبارتند از: *Boleophthalmus*، *Periophthalmus*، *Periophtalmodon*، *Scartelaos* و از این میان، بالاترین غنای گونه‌ای مربوط به جنس*Periophthalmus* است (Aguillar, 2000; Murrdy, 1989). از جنس *Periophthalmus* تنها گونه‌ی *Periophthalmus waltoni* در ایران پراکنش داشته و پراکنش آن از خلیج فارس تا غرب هند است (LarvaBase.org). *Periophthalmus waltoni* گونه‌ای گیاه‌خوار است که از ویژگی‌های ریختی آن، بدن خاکستری متمایل به قهوه‌ای با لکه‌های تیره که روی نیمی از باله‌های پشتی در بین شعاع لکه‌هایی وجود دارد و در سطح بالای بدن نیز دارای یک خط طولی متمایل به سفید است. محل زندگی این گونه در حاشیه‌ی رودها و رودخانه‌ها با آب نسبتا گرم و بسترهای گلی با حفرات خالی است (تصویر ۱) (محمدپور و همکاران، ۱۳۸۹).

تصویر ۱: نمای جانبی گونه *Periophthalmus waltoni*

بروز و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجب ایجاد چالش‌های منحصربه‌فرد هم در علم و هم در 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 (Fuochi *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 تهدید کننده محیط خارجی، نقش مهمی در سلامت و بهداشت ماهیان ایفا می‌کند (McKim & Lien, 2001). لایه‌ی موکوسی بر روی سطح بدن ماهی، عملکردهایی مانند مقاومت به بیماری، تنفس، تنظیم اسمزی و یونی، حرکت، ارتباط، تغذیه و ساخت آشیانه انجام می‌دهد (Subramanian *et al.*, 2008). در واقع، محیط آبی دارای پاتوژن‌های مختلف است و لایه‌ی موکوسی سد فیزیکی را ایجاد می‌کند که اولین خط دفاعی است و نقش مهمی در ایمنی ذاتی ماهی ایفا می‌کند (Fuochi *et al.*, 2017). لیریو و همکاران بیان کرده‌اند که موکوس سطحی یا ماده‌ی لزج

ماهی حاوی موادی مانند کرینوتوکسین‌ها (Crynotoxin)، کالمودولین (Calmodulin)، فرمون‌ها، انواعی از مواد ضد بیماری‌زا مانند اسیدهای‌چرب، ایمونوگلوبولین‌ها، اجزای کمپلمان، لکتین‌ها، لیزوزیم‌ها، آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی پروتئین و سایر پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی است (Lirio *et al.*, 2018).

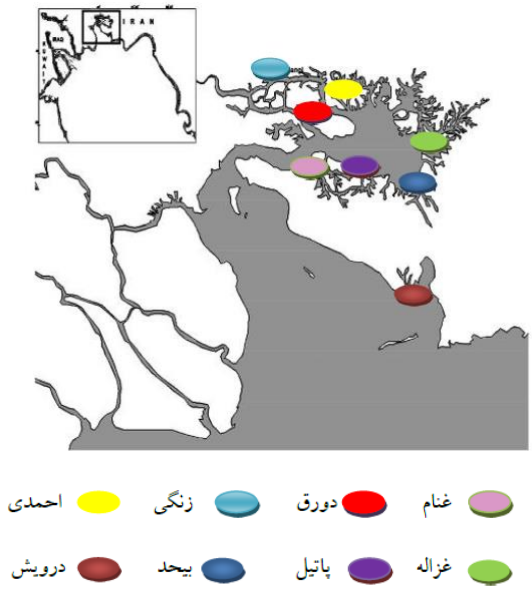
اطلاعات در دسترس در مورد عملکرد ضد میکروبی موکوس اپیدرم، به تعداد محدودی گونه‌ی ماهی محدود است. ویژگی ضد میکروبی موکوس اپیدرمی در برابر پاتوژن‌ها در ابتدا در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اثبات شد. از طرفی مشخص شد که حذف موکوس اپیدرمی در گونه‌هایی مانند شیرین‌ماهی (*Plecoglossus altivelis*) و سپرماهی (*Scophthalmus maximus*) بعد از چالش با *Listonella anguillarum*، موجب افزایش مرگ و میر شد (Subramanian *et al.*, 2008). در این راستا، Austin و همکاران (Austin *et al.*, 1995) نیز نشان دادند که عصاره موکوسی به‌دست آمده از سطح قزل‌آلای رنگین کمان (*Salmo gairdneri*) فعالیت ضد باکتریایی نشان داده است. بر اساس مطالعات Kumari و همکاران ترکیب و میزان ترشح موکوس از گونه‌ای به گونه‌ی 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 (Kumari *et al.*, 2019; Subramanian *et al.*, 2008). از طرفی تحقیقات نشان داده است که موکوس دهان و پوست در خانواده‌ی گاوماهیان دارای خاصیت ضد باکتریایی است به‌طوریکه برخی از باکتری‌ها از جمله *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Klebsiella oxytoca*، *Lactobacillus bulgaricus* و *Escherichia coli* به آن حساسیت نشان می‌دهند (Ravi *et al.*, 2010).

با بررسی منابع موجود تاکنون مطالعه ای در مورد اثر ضدباکتریایی موکوس *Periophthalmus waltoni* انجام نشده است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدباکتریایی موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni* علیه برخی پاتوژن های شاخص شامل *Escherichia coli*، *Bacillus subtillis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* است. همچنین تاثیر دو فاکتور جنسیت ماهی و فصل نیز در میزان اثر ضدباکتریایی موکوس *Periophthalmus waltoni* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری در منطقه جزرو مدی در خور غنام واقع در شمال غرب خلیج فارس، محدوده ای با مختصات جغرافیایی (عرض جغرافیایی22°30'۸/۲۶" و طول جغرافیایی ۴۹°۳'۸/۲۹") به صورت فصلی انجام شد (تصویر ۲). نمونه برداری در طی فصول مختلف با دست و گاهی نیز با تور ساچوک انجام شد. پس از شناسایی گونه‌ها با کلیدهای شناسایی موجود (Murdy,1989 ;Coad,2010; Larson & Takita.2004)، تعداد ۷۰ نمونه ماهی گلخورک *Periophthalmus waltoni* شناسایی و جهت تعیین جنسیت و انجام بررسی‌های ضدباکتریایی، به صورت زنده و با کمک آکواریوم پرتابل به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه شهید

چمران اهواز منتقل شدند. تعیین جنسیت با کمک پاپیلای تناسلی انجام شد . به این صورت که این پاپیلا برای افراد ماده به شکل بیضی و برای افراد نر به شکل مثلث است(کیوانی, ۱۳۸۴)



تصویر ۲: موقعیت خورهای منطقه‌ی ماهشهر خوزستان

مطالعه‌ی خواص ضد میکروبی موکوس پوست

جمع‌آوری موکوس پوست: موکوس پوست ماهیان براساس روش (Subramanian *et al* ., 2008) جمع‌آوری شد. با این هدف، در ابتدا به‌منظور اعمال استرس گرسنگی، تغذیه‌ی ماهیان ۲۴ ساعت قبل از جمع‌آوری موکوس متوقف و سپس ماهی‌ها با پودر گل میخک (۵ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش شدند. برای به حداقل رساندن باکتری‌های متصل به سطح بدن و از بین رفتن سایر آلودگی‌ها، ماهی‌ها درون آب سرد و تمیز وارد شدند و بلافاصله با کمک دستکش استریل به‌صورت انفرادی درون کیسه‌های زیپ‌پلاست حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار داده شدند. پس از سه دقیقه ماهیان از کیسه خارج و به ظرفی با اکسیژن‌دهی مناسب منتقل شدند و سپس محلول حاوی سدیم کلرید و موکوس به لوله‌های فالکون منتقل شد.

تهیه‌ی عصاره موکوسی با رقت‌های مختلف: به‌منظور تهیه‌ی عصاره، محلول حاوی سدیم کلرید و موکوس جمع‌آوری شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در شرایط ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به‌دست آمده جمع‌آوری شده و تحت شرایط استریل در دمای اتاق خشک گردید. پودر حاصل را با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن کرده و پس از حل کردن در آب مقطر استریل(به‌عنوان حلال)، عصاره تام تهیه شد. در نهایت محلول بدست آمده با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد و جهت بررسی اثر ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی قدرت ضد باکتریایی موکوس به روش انتشار در دیسک: به‌منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی موکوس از روش انتشار دیسک و اندازه‌گیری حداقل ناحیه‌ی مهاری (Zone of Inhibition= ZOI) استفاده شد (Baner *et al.*, 1991; Mangena & Muyima, 1999). ابتدا باکتری‌های مورد آزمایش (سویه‌های بیماری‌زای شاخص استاندارد که از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد شامل: *Escherichia coli, Bacillus subtillis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*)، در محیط مولرهینتون براث کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۵ مک فارلند در محیط مولر هینتون‌براث تهیه شد. حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از این مایع تلقیح اولیه، توسط سواپ پنبه‌ای استریل به پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار افزوده شد. در ادامه دیسک‌های بلانک استریل که به عصاره رقیق شده (با غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) آغشته شده بودند با فاصله بر روی محیط کشت قرار داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد (ZOI) بر حسب میلی‌متر با خط‌کش اندازه‌گیری شد. این آزمایش برای هر سویه از باکتری‌های استاندارد سه بار تکرار شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) موکوس: حداقل غلظت مهاری به روش ماکرودیلوشن براث (Macro-broth dilution) و حداقل غلظت کشندگی عصاره علیه دو باکتری بیماری‌زا که طبق نتایج مرحله‌ی قبل، نسبت به سایر باکتری‌های مورد آزمایش حساس‌تر بودند، تعیین شد (Sindambiwe *et al.*, 1999; Vanden *et al.*, 1991). به‌منظور بررسی MIC، سوسپانسیون باکتریایی استاندارد معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند به لوله‌های حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث و غلظت‌های مختلف عصاره موکوس (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمادهی شدند. اولین لوله‌ای که در سری ذکر شده فاقد رشد قابل دیدن بود به‌عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، یک لوپ استاندارد از لوله‌هایی که فاقد رشد قابل مشاهده باکتری بودند روی پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. حداقل غلظتی که از تشکیل کلونی روی محیط آگار جلوگیری کرده بود به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۱ و آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و چندمتغیره MANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

به طور کلی موکوس پوست ماهیان مختلف، طیف ضدمیکروبی گسترده‌ای علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن نشان می دهد. (Lee *et al.*, 2020) که این طیف به شرایط گونه‌ای و زیستگاهی و تغذیه‌ای ماهی بستگی دارد و همین امر می‌تواند مقدار

ترشح موکوس و اجزای آن را در گونه‌ها یا بین گونه‌ها تحت تاثیر قرار داده و همچنین در فراهم کردن انواع پاسخ‌ها و اجزای ایمنی کمک‌کننده باشد (Kumari *et al.*, 2019).

بررسی اولیه‌ی اثر ضد میکروبی موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni*

روش انتشار دیسک، رایج‌ترین روش استفاده‌شده برای تست حساسیت ضد میکروبی در مطالعات موکوس پوست ماهی است (Lee *et al.*, 2020). اثر ضد میکروبی عصاره موکوس به‌دست‌آمده از ماهی *Periophthalmus waltoni* در چهار غلظت (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) علیه چهار باکتری (*Escherichia coli*، *Bacillus subtillis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*) طی دو فصل پاییز و بهار مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن‌ها در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج اثر ضد باکتری قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی متر) عصاره موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* در فصل پاییز علیه سویه‌های استاندارد چهارنوع باکتری

غلظت عصاره / باکتری	25	50	100	200
Bacillus subtillis (۶۶۳۳)	11±0/48 ^{e}	12±0/52 ^{cd}	14 ±0/31 ^{b}	16±0/17 ^{a}
Escherichia coli (۲۵۹۲۲)	10±0/21 ^{f}	11±0/21 ^{c}	14±0/21 ^{b}	16±0/33 ^{a}
Staphylococcus aureus (۶۵۳۸)	9±0/22 ^{fg}	11±0/17 ^{e}	12±0/17 ^{c}	14±0/31 ^{b}
Pseudomonas aeruginosa (۹۰۲۷)	0±0/00 ^{g}	0±0/00 ^{fg}	9±0/33 ^{f}	11±0/31 ^{de}

* نداشن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) است.

جدول ۲: نتایج اثر ضد باکتری قطر هاله‌های عدم رشد (برحسب میلی‌متر) عصاره موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* در فصل بهار علیه سویه‌های استاندارد چهارنوع باکتری

غلظت عصاره / باکتری	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
Bacillus subtillis	13±0/57 ^{e}	14±0/31 ^{cd}	16±0/34 ^{b}	18±0/22 ^{a}
Escherichia coli	11±0/37 ^{f}	14±0/31 ^{c}	16±0/40 ^{b}	18±0/21 ^{a}
Staphylococcus aureus	11± 0/31 ^{fg}	12±0/31 ^{e}	14±0/26 ^{c}	16±0/42 ^{b}
Pseudomonas aeruginosa	8±0/31 ^{g}	9±0/21 ^{fg}	10±0/22 ^{f}	12±0/22 ^{de}

* نداشن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در هر دو فصل پاییز و بهار تمام باکتری‌های مورد آزمایش، نسبت به غلظت‌های بررسی‌شده عصاره، حساسیت نشان دادند و هاله عدم رشد در بین باکتری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار (P<0/001) بود. در این میان باکتری *Bacillus subtillis* با میانگین هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر، حساس ترین و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با میانگین هاله عدم رشد ۷ میلی‌متر مقاوم‌ترین باکتری نسبت به عصاره مورد آزمایش بود. به‌طور کلی باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus subtillis* و *Staphylococcus aureus* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* حساسیت بیشتری نسبت به عصاره مطالعه‌شده نشان دادند.

در مقایسه با مطالعه حاضر، Wei و همکاران (Wei *et al.*, 2010) گزارش دادند که عصاره خام موکوس *Channa striatus*، ZOI معادل ۸ میلی‌متر را علیه *Aeromonas hydrophia* نشان داد درحالیکه هیچ تاثیر ضد باکتریایی نسبت به *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* نشان نداد. بااین‌حال، در مطالعه Balasubramanian و همکاران (Balasubramanian *et al.*, 2012) تاثیر ضد باکتریایی عصاره موکوس *Ctenopharyngodon idella*، علیه *Klebsiella pneumoniae* (۷ میلی‌متر) کمترین تاثیر را داشته درحالیکه باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* (۱۵ میلی‌متر) و *Escherichia coli* (۱۷ میلی‌متر) حساسیت بیشتری نسبت به عصاره موکوس از خود نشان دادند. از طرفی، نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Fuochi و همکاران (Fuochi *et al* ., 2017) نیز مغایرت داشت چراکه نتایج نشان‌دهنده‌ی این موضوع بود که موکوس پوست *Dasyatis pastinaca* فعالیت ضد باکتریایی ویژه و برجسته‌ای علیه باکتری‌های گرم‌منفی نشان داد و نسبت به باکتری‌های گرم‌مثبت، فعالیتی نداشت. این واکنش نسبت به گرم-منفی‌ها را می‌توان بواسطه ماهیت مولکول‌های فعال توضیح داد. در واقع اکثر پپتیدهای ضد میکروبی باید دارای دو شرط باشند: بار کاتیونی خالص و قابلیت اتخاذ ساختارهای آمفی‌پاتیک. ویژگی اول، امکان جذب به غشاهای باکتریایی که دارای بار منفی هستند (مخصوصا انواع گرم-منفی) را فراهم ساخته و ویژگی دوم، امکان برهمکنش و جذب در باکتری‌ها را فراهم می‌سازد (Mahadevan et al., 2019).

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که خاصیت ضد باکتریای عصاره موکوس با افزایش غلظت افزایش پیدا می‌کند به این‌صورت که برای تمام باکتری‌های مورد بررسی بزرگ‌ترین هاله عدم رشد در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره و کوچک‌ترین هاله عدم رشد در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره طی دو فصل پاییز و بهار نشان داد که اثر متقابل بین دو عامل باکتری و فصل دارای اختلاف معنی‌دار آماری (P=0/001) است به این صورت که عصاره تهیه شده در فصل بهار هاله عدم رشد بزرگ‌تری نسبت به فصل پاییز نشان داد. بااین‌حال، هاله عدم رشدی مربوط به باکتری‌های *Escherichia coli* و *Bacillus subtillis* با هم تفاوت معنی داری نداشتند ولی به‌صورت کلی میانگین هاله عدم رشد برای باکتری *Bacillus subtillis* (14/35 میلی‌متر) بیش‌تر از

باکتری *Escherichia coli* با میانگین هاله عدم رشد ۷۶/۱۳میلی‌متر بود. از طرفی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* طی دو فصل بهار و پاییز تفاوت معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد نشان نداد ولی میانگین هاله عدم رشد در بهار (11 میلی‌متر) بیش‌تر از این میانگین در پاییز (10 میلی‌متر) بود. در مجموع بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری *Bacillus subtillis* در فصل بهار با میانگین ۱۵ میلی‌متر و کم‌ترین میانگین هاله عدم رشد (۱۰ میلی‌متر) مربوط به باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در فصل پاییز بود (جدول ۳).

جدول ۳: تاثیر فصل بر روی خاصیت ضد میکروبی عصاره موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* علیه سویه‌های استاندارد چهار نوع باکتری

فصل / باکتری	پاییز	بهار
Bacillus subtillis	13±0/46 [b]	15±0/52 [a]
Escherichia coli	13±0/55 [b]	15±0/72[a]
Pseudomonas aeruginosa	10 ± 0/32 [d]	11±0/43 [d]
Staphylococcus aureus	12±0/37 [c]	14±0/48 [b]

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد (P<0/05) است.

بررسی همزمان تاثیر فصل و غلظت عصاره بر خاصیت ضد میکروبی موکوس نشان داد که بین این دو عامل اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P=0/001) به این صورت که در هر غلظت میانگین هاله عدم رشد در فصل بهار و پاییز باهم اختلاف آماری داشته و در همه‌ی موارد موکوس تهیه‌شده در فصل بهار از خود خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نشان داد. همچنین در هر فصل با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد باکتریایی هم افزایش یافت به این ترتیب که بیش‌ترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شده در فصل بهار با میانگین هاله عدم رشد 16 میلی‌متر و کم‌ترین خاصیت ضد باکتریایی مربوط به غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شده در فصل پاییز با میانگین هاله عدم رشد ۱۰ میلی‌متر بود (جدول ۴).

در فصل بهار که اوج رسیدگی جنسی و نیز تخمگذاری در این ماهیان می‌باشد بدن ماهی حساسیت بالایی به محیط نشان می‌دهد و به شدت تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار دارد که همین تنش‌ها محرکی برای تولید موکوس با کیفیت بالاتر می‌شود (Bereiter., 1986) از سوی دیگر با افزایش مقدار غذای مصرفی و نیز بهبود مواد غذایی که در طی فصل بهار صورت می‌گیرد میزان متابولیسم در بدن افزایش می‌یابد و ساختن پروتئین‌های دفاعی با کارایی بالاتری صورت می‌گیرد همه این عوامل در نهایت منجر به افزایش خاصیت ضدمیکروبی موکوس تولید شده در فصل بهار می‌گردند (Nordgarden *et al*., 2002; Krogdahl *et al*., 2004).

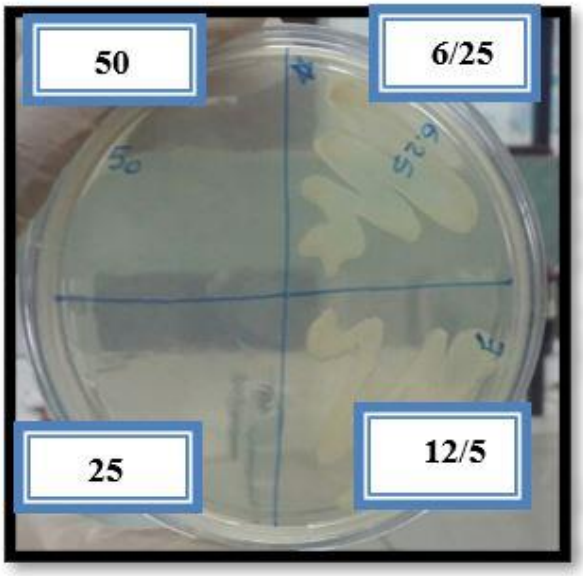
جدول ۴: تاثیر همزمان فصل و غلظت عصاره بر خاصیت ضد میکروبی موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni*

فصل / غلظت	پاییز	بهار
۲۵	$10\pm0/23^{f}$	$10\pm0/33^{ef}$
۵۰	$11\pm0/22^{e}$	$13\pm0/45^{d}$
۱۰۰	$12\pm0/44^{d}$	$15\pm0/43^{c}$
۲۰۰	$15\pm0/40^{b}$	$16\pm0/63^{a}$

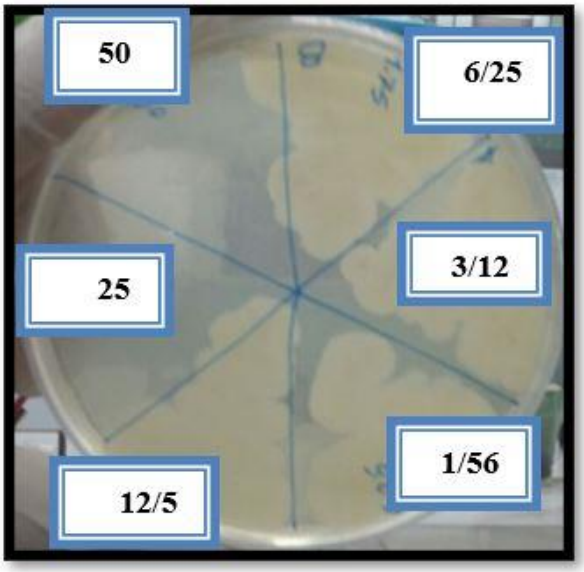
* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) است.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni*

برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از باکتری‌های *Bacillus subtillis* و *Escherichia coli* که حساسیت بیش‌تری در برابر عصاره تهیه شده از موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni* داشتند استفاده شد. مطابق با نتایج به‌دست آمده در فصل پاییز حداقل غلظت مهارکنندگی برای *Bacillus subtillis* و *Escherichia coli* غلظت12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی برای هر دو باکتری غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (تصاویر ۳ و ۴).

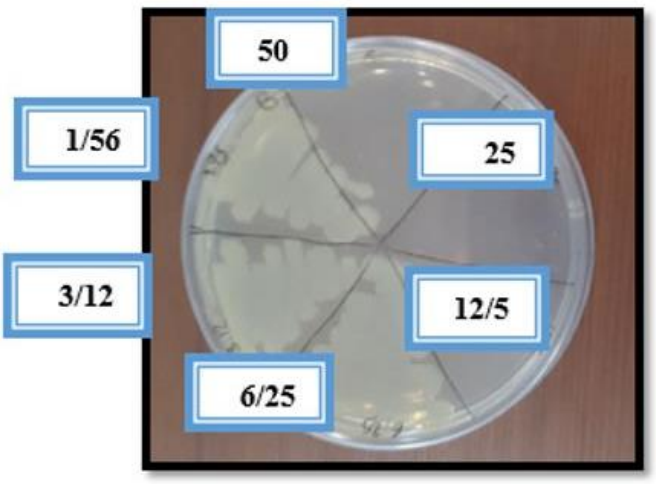


تصویر ۳: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری *Escherichia coli* طی فصل پاییز

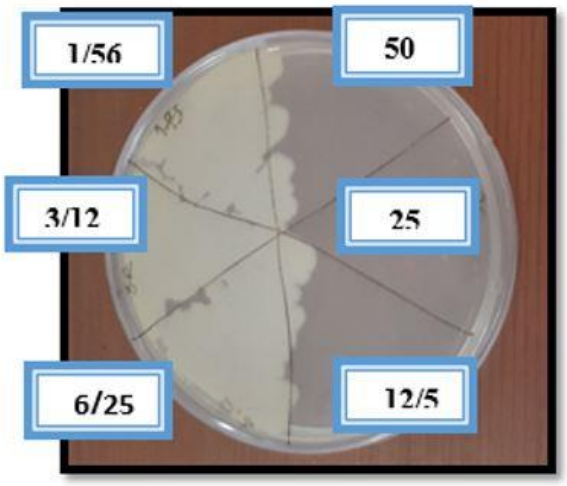


تصویر ۴: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری Bacillus subtillis طی فصل پاییز

مطالعات انجام‌شده بر روی موکوس به‌دست آمده از نمونه‌ها در فصل بهار نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌ها غلظت 6/25 میلی‌گرم و حداقل غلظت کشندگی برای آن‌ها غلظت 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (تصاویر ۵ و ۶). این نتایج نشان می‌دهد که عصاره به‌دست آمده از موکوس ماهی در فصل بهار، دارای خاصیت ضد باکتریایی بالاتری بود.



تصویر ۵: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری *Bacillus subtillis* طی فصل بهار



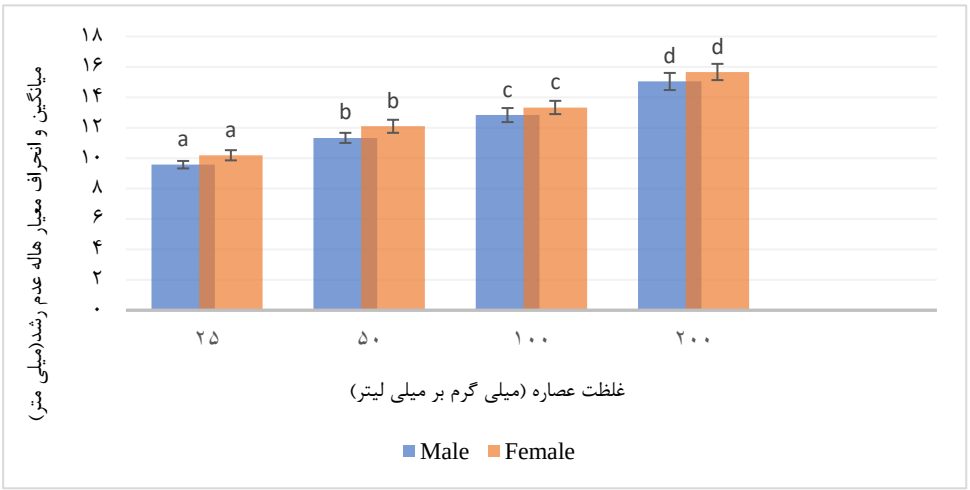
تصویر ۶: نتیجه MBC عصاره موکوس علیه باکتری *Escherichia coli* طی فصل بهار

در سایر مطالعات نیز محققان زیادی به بررسی MIC عصاره‌های موکوس پوست گونه‌های مختلف ماهی پرداخته‌اند که نتایج به‌دست آمده با مطالعه‌ی حاضر قابل قیاس است. Erban و همکاران (Erban *et al.*, 2000) سه پروتئین گلیکوزیله با وزن‌های مختلف را از سوپرناتانت هیدروفوب موکوس پوست مارماهی و قزل‌آلا معرفی کردند که مقدار MIC مربوط به آن، در گستره ۱ تا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد. از سوی دیگر، Lemaitre و همکاران (Lemaitre *et al.*, 1996) گزارش کردند که پروتئین‌های گلیکوزیله‌شده‌ی جداشده از *Cyprinus carpio*، رشد تمام پاتوژن‌های تست شده را در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر مهار می‌کند. مطابق با نتایج به‌دست آمده از مطالعه Kumari و همکاران (Kumari *et al.*, 2019) MIC مربوط به عصاره‌های ماهیان مطالعه شده برای *Klebsiella pneumoniae* ، *Escherichia coli* و *Bacillus cereus*، ۲۵میکروگرم در میلی لیتر و برای *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus aureus* و *Aeromonas hydrophila* ، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به‌دست آمد. از طرفی مقدار ترشح موکوس در میان سه گونه ماهی بررسی‌شده توسط این محققان متفاوت بود. این تغییر در مقدار ترشح موکوس را می‌توان به شرایط اکولوژیکی و فیزیولوژیکی مختلف و همچنین به سلول‌های مختلف تولیدکننده‌ی موکوس نسبت داد که در لایه‌های اپیدرمی گونه‌های مختلف ماهی وجود دارد (Lethbridge., 1982 & Smith., 1977).

در مطالعه Mahadavan و همکاران (Mahadavan *et al.*, 2019) MIC مربوط به عصاره‌های موکوس گل‌خورک مورد مطالعه در گستره‌ی ۳/۰ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای پاتوژن‌های مختلف باکتریایی و در گستره‌ی ۰/۱ و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای پاتوژن‌های قارچی به‌دست آمد. کمترین مقدار MIC پاتوژن‌های باکتریایی (یعنی ۳ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌ترتیب برای *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* گزارش شد.

نتایج تاثیر جنسیت در میزان اثر ضد میکروبی موکوس پوست ماهی *Periophthalmus waltoni*

نتایج بررسی اثر ضدمیکروبی در این مرحله نشان دهنده ی تفاوت معنی داری بین جنسیت و خاصیت ضدمیکروبی موکوس پوست ماهی نبود (P>0/001). ولی در همه حالت ها مقدار اثرگذاری موکوس تهیه شده از جنس ماده به مقدار هرچند جزئی خاصیت ضدمیکروبی بالاتری نسبت به جنس نر از خود نشان داد. همچنین بیش‌ترین خاصیت ضد باکتریایی در مورد عصاره تهیه شده از ماهی ماده در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (با میانگین هاله عدم رشد ۱۶ میلی‌متر) مشاهده شد این درحالیست که عصاره تهیه شده از ماهی نر در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با میانگین هاله عدم رشد ۱۰ میلی‌متر کم‌ترین خاصیت ضد باکتریایی را داشت (نمودار ۱).

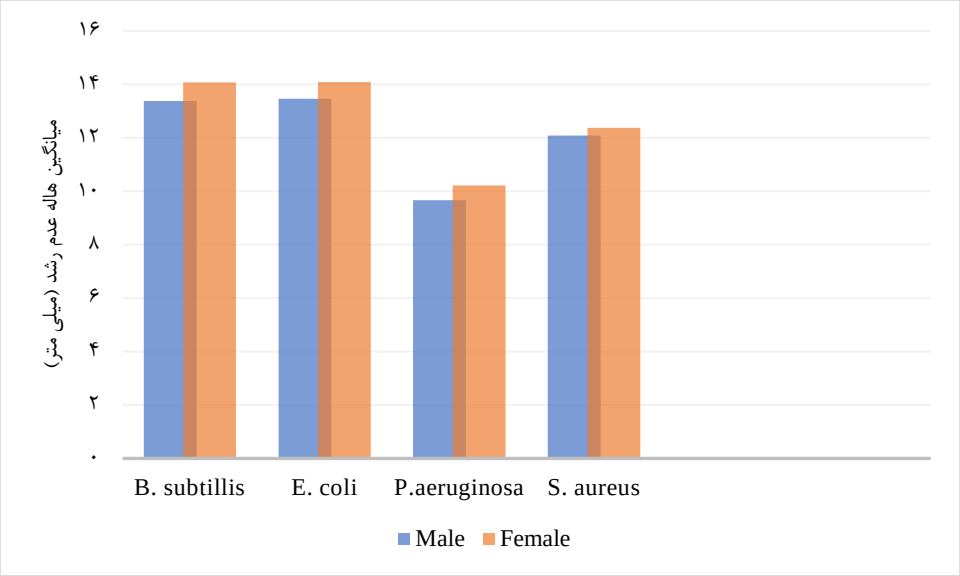


نمودار ۱: مربوط به اثر ضد باکتریایی عصاره بدست آمده از موکوس ماهی نر و ماده در غلظت‌های مختلف (تاثیر جنسیت و غلظت عصاره)

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد (P<0/05) است.

نمودار مربوط به اثر ضد باکتریایی عصاره بدست آمده از موکوس ماهی نر و ماده علیه باکتری‌های مختلف مورد آزمایش (تاثیر جنسیت) نشان داد که در همه حالت‌ها موکوس تهیه‌شده از ماهی ماده خاصیت ضد باکتریایی کمی قوی تر نسبت به جنس نر دارد (هرچند تفاوت معنی دار نبود و P>0/001) و از میان باکتری‌های مورد سنجش نیز باکتری *Bacillus subtillis* بیشترین حساسیت و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره نشان دادند. همچنین باکتری

Escherichia coli و باکتری *Bacillus subtillis* تفاوت معنی‌داری در هاله عدم رشد از خود نشان ندادند با این وجود میانگین هاله عدم رشد باکتری *Bacillus subtillis* با ۱۵ میلی‌متر، کمی بیشتر از میانگین هاله عدم رشد در باکتری *Escherichia coli* (14 میلی‌متر) بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: بررسی تاثیر ضد باکتریایی عصاره بدست آمده از موکوس ماهی نر و ماده علیه باکتری‌های مختلف مورد آزمایش (تاثیر جنسیت)

نتایج بررسی اثر متقابل جنسیت ماهی و فصل بر روی خاصیت ضد باکتریایی موکوس دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0/001$) بود به این صورت که میانگین هاله عدم رشد برای هر جنس، در فصل بهار بیش‌ترین مقدار را داشت. همچنین در هر فصل موکوس تهیه شده از ماهی جنس ماده خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به موکوس تهیه شده از جنس نر دارد (جدول ۵).

جدول ۵: بررسی تاثیر همزمان جنسیت ماهی و فصل بر روی خاصیت ضد باکتریایی موکوس *Periophthalmus waltoni*

جنسیت / فصل	ماده	نر
بهار	$13\pm0/47^{b}$	$12\pm0/47^{a}$
پاییز	$13\pm0/37^{c}$	$11\pm0/36^{b}$

* نداشتن حرف مشترک به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) است.

در زمینه‌ی بررسی تاثیر جنسیت بر فعالیت ضدباکتریایی موکوس، مطالعاتی بر روی تعداد محدودی از گونه‌های ماهی انجام شده است. به‌عنوان مثال، غفوری و همکاران (Ghafoori *et al.*, 2014) در مطالعات خود، تغییرات چشمگیری در لیزوزیم موکوس و سرم در *Rutilus frisii kutum*های (ماهی سفید دریای خزر) نر و ماده در دماهای فصلی مختلف، رشد گنادی مشاهده

کردند. نسبت تاثیر فاکتورها بر روی تغییرات لیزوزیم، بواسطه‌ی فاکتورهای دمای فصلی (فاکتور اصلی)، فعالیت تولید مثلی و مهاجرت (با تاثیر قابل چشمپوشی)، ترتیب کاهشی نشان داد درحالیکه مقدار لیزوزیم در نمونه‌های نر و ماده، اختلاف چشمگیری نداشت. با کاهش دما و آغاز فصل سرد، کاهش لیزوزیم سرم و موکوس در هر دو جنس نر و ماده مشاهده شد. این موضوع نشان می‌دهد که فاکتورهای فصلی مانند دما می‌تواند بر لیزوزیم به‌عنوان پارامتر ایمنی غیر اختصاصی تاثیر بگذارد. به‌طور کلی همبستگی مثبتی بین فعالیت لیزوزیم و دمای آب در بسیاری از گونه‌ها مانند *Pleuronectes platessa*، *Salmo trutta* ، *Limanda limanda* گزارش شده است. به‌نظر می رسد با کاهش دما، متابولیسم ماهی و میزان پاتوژن میکروبی در محیط کاهش می یابد که این دو عامل در نهایت باعث کاهش میزان لیزوزیم موجود در موکوس ماهی می شود که دلیل بر افت فعالیت ضدمیکروبی موکوس است (Jung *et al*., 2012).

لیزوزیم، پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۱۸-۱۴ کیلودالتون یکی از اجزای کلیدی سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی است. این آنزیم در گستره‌ی وسیعی از مهره‌داران شامل ماهیان دریازی و آب شیرین وجود دارد. این آنزیم مستقیما بر باکتری‌های گرم‌مثبت و لایه‌ی پپتیدوگلیکان داخلی باکتری‌های گرم‌منفی اثر گذاشته و با استفاده از کمپلمان و سایر آنزیم‌ها، موجب از هم گسیختن دیواره‌ی خارجی می‌شود. لیزوزیم، عامل ضد باکتریایی است که توسط سلول‌های سفید خون (عمدتا نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها و به مقدار کمتری ماکروفاژها) و بافت‌های غنی از لوکوسیت (مانند کلیه، طحال، موکوس پوست، آبشش‌ها و مجرای گوارشی) ترشح می‌شود (Ferguson *et al*., 1989). بر این اساس این موضوع که فعالیت لیزوزیم می‌تواند در جنس نر و ماده متفاوت باشد نیز مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، Fletchert & White (Fletchert & White, 1976) کاهش چشمگیر فعالیت لیزوزیم سرم را در ماهی lumpsucker نر (*Cycloptreus lumnus*) طی فصل پرورش گزارش دادند در صورتی که فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی ماده افزایش یافت. Wang و همکاران (Wang *et al*., 2003) نیز نشان دادند که فعالیت سیستم ایمنی در جنس نر و ماده‌ی *Perca fluviatilis* طی دوره‌ی تخم‌ریزی متغیر است به‌طوریکه مقدار فعالیت مربوط به جنس ماده به‌طور چشمگیری بالاتر از جنس نر گزارش شد. فاکتورهایی که فعالیت ضد باکتریایی لیزوزیم را تحت تاثیر قرار می‌دهند عبارتند از فصل، دمای محیطی، استرس، گونه‌های ماهی، جنس، سن ماهی، بلوغ جنسی و مواد محرک ایمنی مانند گلوکان (Ghafoori *et al*., 2014). در مطالعه‌ی حاضر هرچند جنسیت تفاوت معنی داری بر روی خاصیت ضد میکروبی موکوس ماهی نداشت ولی قوی‌تر بودن جزئی موکوس ماهی ماده برای مقابله با پاتوژن‌های بررسی شده نکته‌ی حائز اهمیتی برای مطالعات بعدی خواهد بود.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج بدست آمده، عصاره موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni* اثر ضد باکتریایی مناسبی علیه سویه های باکتریایی مورد آزمایش نشان داد. همچنین فاکتور فصل بر میزان اثر ضد باکتریایی موکوس تاثیر نشان داد. با توجه به نتایج

بدست امده، عصاره موکوس ماهی *Periophthalmus waltoni* به عنوان یک منبع جدید حاوی ترکیبات ضدمیکروبی می‌تواند در مقابله با باکتریهای بیماریزا امید بخش باشد و با توجه به پتانسیل ضدباکتریایی عصاره موکوس گل‌خورک *Periophthalmus waltoni*، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی تاثیر جنسیت ماهی بر روی خاصیت ضدمیکروبی موکوس پوست بیشتر مورد بررسی قرارگیرد.

منابع

دانشفر، ح (۱۳۸۸) جانورشناسی مهره‌داران. جلد دوم، چاپخانه مدرسه، ۹۱۶ صفحه.

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 گل‌خورک *Periophthalmodon schlosseri* براساس شاخص وقوع در سواحل جزر و مدی خور سماعیلی ماهشهر. مجله بیولوژی دریا، صفحات ۹۲-۱۰۲.

Aguilar, N. (2000). Comparative physiology of air breathing gobies. PhD Thesis. University of California. San Diego. USA.

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I. and 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: 93–96.

Balasubramanian, S., Baby Rani, P., Arul Prakash, A. and Prakash, M. (2012). Antimicrobial properties of skin mucus from four freshwater cultivable Fishes (*Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Labeo rohita* and *Ctenopharyngodon idella*). African Journal of Microbiology Research, 6(24): 5110–5120.

Baner, A.W., Kirby, W.M.M., Sherries, J.C. and Truck, M. (1991). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, 45: 493- 496 .

Coad, B.C., (2010). Fresh water fish of Iraq. Canadian museum of nature, P.O. Box3443.station D, attuwa, Onatorio, Canada.

Ferguson, H.W. (1989). Systemic pathology of fish. Iowa state university press, Ames, in: the laboratory fihe, ostrander, G.K, Academic Press .

Fletchert, T.C. and White, A. (1977). Baldo, B.A. C-reactive protein-like precipitation and lysozyme in lumpsuker *Cyclopterus lumpus L.* during the breeding season. Comparative Biochemistry and Physiology, 57: 353-357.

Fuochi, V., Volti, G.L., Camiolo, G., Tiralongo, F., Giallongo, C., Distefano, A., Petronio, G.P., Barbagallo, I., Viola, M., Furneri, P.M., Di Rosa, M., Avola, R. and Tibullo, D. (2017). Antimicrobial and Anti-Proliferative Effects of Skin Mucus Derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). Marine Drugs, 15(11): 342.

Ghafoori, Z., Heidari, B., Farzadfar, F. and Aghamaali, M. (2014). Variations of serum and mucus lysozyme activity and total protein content in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901) during reproductive period. Fish and Shellfish Immunology, 37(1): 139-46.

Hickman, C.P., Roberts, L.S., Larson, A., Ober, W.C. and Garrison, C. (2001), Integrated principles of zoology Vol. 15, McGraw-Hill, New York.

Jung, T.S., Castillo, C.S.D., Javaregowda, P.K., Dalvi, R.S., Nho, S.W. and Bin, P.S. (2012). Seasonal variation and comparative analysis of nonspecific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Developmental & Comparative Immunology, 38(2): 295–301.

Krogdahl, A., Sundby, A. and Olli, J(.2004 .)Atlantic salmon (Salmo salar) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. Aquaculture, 229: 335–360

Kumari, S., Tyor, A.K. and Bhatnagar, A. (2019). Evaluation of the antibacterial activity of skin mucus of three carp species. International Aquatic Research, https://doi.org/10.1007/s40071-019-0231-z .

Larson H., Takita T(.2004 .)Two new species of Periophthalmus (Teleostei: Gobiidae: Oxudercinae) from northern Australia, and a re-diagnosis of Periophthalmus novaeguineaenis. The Beagle, Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory, 20: 175-185

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: 1–21.

Lemaitre, C., Orange, N., Saglio, P., Saint, N., Gagnon, J. and Molle, G. (1996). Characterization and ion channel activities of novel antimicrobial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). European Journal of Biochemistry, 240:143–149 .

Lethbridge, R. and Potter, I.C. (1982). In the biology of lampreys. Academic Press, 3:377–448 .

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 .

Mahadevan, G., Mohan, K., Vinoth, J. and Ravi, V. (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, 80:13 .

Mangena, T. and Muyima, N.Y. (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.

McKim, J. and Lien, G. (2001). Toxic responses of the skin in Schlenk and Benson target organ toxicity in Marine and fresh water Teleost. 224 pages, Taylor & Francis. New York .

Murdy, E. (1989). A taxonomic revision and cladistics analysis of the Oxudercinae gobies (Gobiidae: Oxudercinae). Research Australia Museum Supply, 11: 1-93.

Nordgarden, U., Hemre, G.I. and Hansen, T(.2002 .)Growth and body composition of Atlantic salmon (Salmo salar L.) parr and smolt fed diets varying in protein and lipid contents. Aquaculture, 207: 65– 78.

Ravi, V., Kesavan, K., Sandhya, S. and Rajagopal, S. (2010). Antibacterial activity of the mucus of mudskipper *Boleophthalmus boddarti* (Pallas, 1770) from Vellar Estuary. AES Bioflux, 2(1): 32-40.

Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Cos, P., Totte, J., Pieters, L. and Vlietinck, A. (1999). Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activites. Journal of Ethnopharmacology, 65(1): 71-77.

Smith, R.J. (1977). In hemical signal in vertebrates' plenum, New York in the laboratory fish, Ostrander, New York.

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, Part B, 150: 85–92.

Wang, N., Migaud, L., Acerete, L., Gardeur, N.J., Tort, L. and Fontaine, P. (2003). Mortality in non-specific immune response of Eurasian perch *Perca fluviatilis* during the spawning season. Fish Physiology and Biochemistry, 25: 523-524.

Wei, O.Y., Xavier, R. and Marimuthu, K. (2010). Screening of antibacterial activity of mucus extract of snakehead fish, *Channa striatus* (Bloch). European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 14:675–681.

Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. and Richards, S. (1986). In the biology of integument. 2 Vertebrates. 1th edition, Springer-Verlag, 855 pages, Pp: 36-64, Berlin, Heidelberg .

Investigation on antibacterial properties of mucus in (*Periophthalmus waltoni* koumans, 1941) mudskipper

A. Makipour[1], A. Jazayeri[2]*, I. Darabpour[3]

Received:2021.4.15
Accepted:2021.5.15

Abstract

Nowadays, emergence and prevalence of drug-resistant pathogenic bacteria has become a great global concern. So, there is an urgent need to discover new antimicrobial agents. The mucus of mudskipper fish may be a new, untapped source for antibacterial agents. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the mucus of *Periophthalmus waltoni*, isolated from Musa estuary, against four pathogenic bacteria, including *Escherichia coli, Bacillus subtillis, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus.* The effect of gender and seasonal variations on antibacterial activity of mucus was also evaluated. After preparation of the aqueous mucus extract, the antibacterial activity was assessed using disc diffusion method. Also, the minimal Inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the mucus extract was determined against two more sensitive bacteria. The results revealed that tested bacteria were susceptible to the mucus extract. *Bacillus subtillis* and *Pseudomonas aeruginosa* were the most susceptible and resistant bacteria to the mucus extract, respectively. The gender of the fish did not make a significant difference in the antimicrobial activity of mucus, However, female fish showed slightly higher antimicrobial activity (P>0/001). It was also found that fish's mucus has the higher antibacterial property in the spring season (P<0/001).

Keywords: *Antibacterial activity, Fish, Mucus, Periophthalmus waltoni*

1- M.Sc., Animal Biology-Biosystematics, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Biology, Ahvaz, Khouzestan, Iran
2-Assistant Professor, Sea Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Biology, Ahvaz, Khouzestan, Iran
*(Corresponding author: A.jazayeri@scu.ac.ir)
3-Assistant Professor, Microbiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Biology, Ahvaz, Khouzestan, Iran