



مقایسه پروفایل و فعالیت ضد میکروبی موکوس اپیدرم فیل ماهی (*Huso huso*, Linnaeus 1758) در رده‌های وزنی مختلف

فاطمه خانی^۱، عبدالمجید حاجی‌مرادلو^{۱*}، رسول قربانی^۱، دلاور شهباززاده^۲، کامران پوشنگ باقری^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

موکوس علاوه بر عملکردهای فیزیکی، حاوی ترکیبات فعال زیستی می‌باشد و اولین خط دفاع میزبان در برابر پاتوژن‌ها محسوب می‌گردد. در مطالعه حاضر، برخی خواص پروتئین‌های موجود در موکوس اپیدرمی فیل ماهی (*Huso huso*) به‌عنوان یکی از گونه‌های بومی سواحل جنوبی دریای خزر در سه رده وزنی مختلف (۰/۴، ۴ و ۴۰ کیلوگرم) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق موکوس به‌طور مستقیم از سطح بدن ماهیان جمع‌آوری و برخی از خواص مانند غلظت کل پروتئین، کروماتوگرام (RP-HPLC) و پروفایل جرم مولکولی پروتئین‌های موکوس در سه رده وزنی مقایسه گردید. بررسی فعالیت ضد میکروبی موکوس با روش‌های انتشار دیسک، کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) مورد بررسی قرار گرفت. هیچ تفاوت معنی‌داری بین غلظت پروتئین کل نمونه‌های خام سه وزن مشاهده نشد (به ترتیب: 1.02 ± 0.01 ، 1.02 ± 0.01 ، 1.04 ± 0.01 ، 1.07 ± 0.02 میکروگرم بر میکرولیتر) در حالی که در بین فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی تفاوت معنی‌داری تنها در غلظت فرکشن چهارم مشاهده شد ($p \leq 0.05$). الگوی پروتئینی (۵-۲۴۵ کیلودالتون) حاصل از SDS-PAGE در سه رده وزنی مشابه بود. در بررسی کروماتوگرام، تعداد فرکشن‌ها (۱۰ فرکشن در طول موج ۲۱۴ نانومتر) کاملاً یکسان و نمودار لگاریتمی زمان ماندگاری منطبق برهم و بدون هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بود در حالی که سطح زیر منحنی در فرکشن‌های ۲، ۵، ۹ و گروه‌های وزنی دارای تفاوت معنی‌داری بود ($p \leq 0.05$). مطالعه حاضر نشان داد که تمام گروه‌های وزنی در کروماتوگرام HPLC و SDS-PAGE دارای ترکیب و ساختار نسبتاً مشابه بودند. انتشار دیسک فعالیت ضدباکتریایی مشابهی را در برابر *A. hydrophila* نشان داد در حالی که در مواجهه با *S. iniae* گروه وزنی اول (۰/۴ کیلوگرم) به‌طور معنی‌داری هاله عدم رشد کمتری را نشان داد ($p \leq 0.05$). تمام گروه‌های وزنی دارای مقادیر MIC و MBC یکسان بودند ($MBC_{48} = MIC_{48} = 25$ میکروگرم) در حالی که در آزمایش انتشار دیسک، در قدرت ضدباکتریایی گروه‌های وزنی در معرض *S. iniae* اختلاف معنی‌داری مشاهده شد که می‌توان به صلاحیت آزمون اشاره کرد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که از نظر ایمنی اولیه (غیر اختصاصی)، گروه وزنی اول به یک سطح تکاملی همسطح وزن‌های بالاتر رسیده است.

واژه‌های کلیدی:

فیل ماهی (*Huso huso*)، موکوس، فعالیت ضد میکروبی، کروماتوگرافی فاز معکوس

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

<https://doi.org/10.22034/jair.10.1.51>

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۰۰/۰۶/۰۸

پذیرش: ۰۰/۰۸/۲۴

نویسنده مسئول مکاتبه:

عبدالمجید حاجی‌مرادلو، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

ایمیل: ahajimoradloo@yahoo.com

۱ | مقدمه

گلیکوپروتئین، پروتئوگلیکان و پروتئین‌هاست که به‌صورت یک سد فیزیکی و شیمیایی عمل می‌کند و علاوه بر نقش محافظتی فیزیکی، حاوی ترکیبات ترشحی متنوعی از جمله آگلوتینین‌ها، لیزین‌ها، لیزوزیم‌ها، مواد رسوب‌دهنده غیراختصاصی، پروتئین فاز حاد و آنتی‌بادی‌های طبیعی است که دارای نقش دفاعی-شیمیایی بر علیه میکروارگانیسم‌های خارجی می‌باشد. با تولید و جایگزینی مستمر موکوس از تثبیت، تشکیل کلنی و نفوذ عوامل بیماری‌زا و به ویژه باکتری‌ها و تک‌یاخته‌ها به لایه‌های اپیدرم جلوگیری می‌شود (Soltani, 2008). دریای خزر بزرگ‌ترین حوضچه داخلی محصور جهان

آبزیان در محیط پیرامون خود به‌طور مداوم در معرض طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زای موجود در آب قرار دارند (Hansen and Olafsen, 1999). علاوه بر این، عوامل تنش‌زا محیطی (به‌عنوان مثال تغییرات دما، نوسانات اکسیژن، و آلاینده‌ها) (Wedemeyer et al., 1984; Hansen and Olafsen, 1999) ممکن است سلامت آنها را با تضعیف خط اول دفاعی مختل کرده و امکان نفوذ و حمله عوامل بیماری‌زا به میزبان فراهم گردد (Hansen and Olafsen, 1999). مجموعه پیچیده‌ای از فاکتورهای ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی در ماهی شناسایی شده است (Ellis, 2001). موکوس ماهی متشکل از

علائمی چون بیرون‌زدگی چشم، زخم‌های سطحی در باله و آبشش ماهیان و زخم در ناحیه دست و پاهای انسان همراه است. ژئونوز بودن و دامنه میزبانی متنوع این بیماری موجب شده تا بیماری از اهمیت بیشتری برخوردار باشد. استرپتوکوکوزیس به‌عنوان بیماری برگشت-پذیر، تعداد بسیاری از ماهیان وحشی و پرورشی آب شور و شیرین را در جهان آلوده می‌نماید (Agnew and Barnes, 2007; Eldar, and Soltani et al., 2005; Ghittino, 1999; Cheng et al., 2010). طبق آمار حاصل از مطالعات متعدد پیرامون دامنه میزبانی و بیماری-زایی ناشی از استرپتوکوس اینیایی در ماهیان، گزارش شده است که ۲۷ گونه به این بیماری حساس بوده و خسارت حاصله بسته به شرایط محیطی و عوامل استرس‌زا از ۵٪ تا ۷۵٪ متفاوت می‌باشد. این بیماری در مورد ماهیان خاویاری نیز گزارش شده است و نشان داده است که این گونه ماهی از حساسیت بالایی برخوردار می‌باشد (Yang and Li, 2009). برخی گونه‌ها همچون کپور ماهیان مقاوم به این بیماری می‌باشند ولی این بیماری یکی از متداول‌ترین بیماری‌های مزارع قزل‌آلای کشور می‌باشد و از سمتی نیز توسعه پرورش ماهیان خاویاری در برنامه توسعه شیلاتی کشور مورد توجه قرار گرفته است، لذا ضروریست تا پیش‌بینی‌های لازم در زمینه مشکلات پیش‌رو مورد توجه قرار گیرد. در مواجهه با بیماری‌ها، موکوس اپیدرم می‌تواند به‌عنوان یک عامل اصلی در سلامتی ماهی در نظر گرفته شود و به‌عنوان اولین خط سیستم ایمنی بدن ایجاد سد فیزیکی یا شیمیایی پایدار در برابر عوامل بیماری-زای مهاجم عمل کند. پروتئین‌های ضد میکروبی و پپتیدها از جمله مؤثرترین عوامل ایمنی موکوسی هستند و نقش دفاعی طبیعی آنها ممکن است باعث هم‌افزایی هم با یکدیگر و هم با سایر عوامل موجود در میزبان شود (Hancock, 2001). محققان به‌منظور غلبه بر مقاومت دارویی، جلوگیری از مصرف بیش از حد داروها و عوارض جانبی ناشی از استفاده از داروها، شناخت و تقویت سیستم ایمنی ذاتی ماهیان را به عنوان یک راهکار جایگزین برای بهبود سلامت و به‌حداقل رساندن وابستگی به داروها مدنظر قرار داده‌اند (Subramanian et al., 2008; Lazado and Caipang, 2014). در این راستا، برخی از فاکتورهای سیستم ایمنی، از جمله پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی، از گزینه‌های مدنظر جهت جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند (Akbari et al., 2018). اطلاعات کمی در مورد خواص و ماهیت موکوس در *Acipenseridae* به‌ویژه از نظر خواص ضدباکتریایی وجود دارد. بیماری این گونه‌های ارزشمند می‌تواند خسارات سنگین و جبران‌ناپذیری داشته باشد. از این رو شناخت ساختار و آگاهی کامل از مکانیسم‌های اساسی ایمنی، و تلاش جهت تقویت آن می‌تواند برای کاهش بروز بیماری‌ها بسیار مفید باشد. براین اساس، این مطالعه با هدف مقایسه غلظت پروتئین موکوس اپیدرمی، الگوی کروماتوگراف، SDS-PAGE و فعالیت ضد میکروبی در *Huso huso* به عنوان یک گونه بومی در ایران انجام شد.

۲ | مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موکوس فیل‌ماهی (*Huso huso*) در سه دامنه وزنی (جدول ۱) مختلف در کارگاه خصوصی پرورش ماهیان خاویاری ساعی

(Dumont, 1988) است و به‌عنوان زیستگاه گونه‌های ماهیان خاویاری باارزش تجاری مانند *Huso huso* به‌ویژه در ایران شناخته می‌شود (Khodorevskaya et al., 1997, Moghim et al., 2006). فیل-ماهی که معمولاً با نام Giant Sturgeon شناخته می‌شود، گونه‌ای در معرض خطر است (Nazari et al., 2009) و بیشتر در حوضه‌های دریای خزر، دریای سیاه و دریای آزوف زندگی می‌کند. این گونه علاوه بر ارزش اکولوژیکی و تنوع زیستی، از نظر برداشت خاویار و نیز گوشت آن به‌عنوان یک غذای مجلل حائز اهمیت می‌باشد (Carmona et al., 2009, Jalali et al., 2009). براساس گزارش IUCN، بیش از ۸۵ درصد از گونه‌های ماهیان خاویاری از جمله فیل‌ماهی، به دلیل صید بیش از حد، از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی، تخریب بستر تخم‌ریزی و هجری‌ها به‌دلیل ساخت‌وسازهای غیرمجاز سدها بر روی رودخانه‌ها و افزایش آلودگی (Carmona et al., 2009) در آستانه انقراض هستند (Bronzi et al., 2011). بهترین راه عملی برای بازسازی جمعیت این ماهیان ارزشمند، تکثیر و پرورش مصنوعی می‌باشد (Hoseinifar et al., 2011). بر این اساس، پرورش ماهیان خاویاری در شرایط محصور بسیار گسترش یافته است. از طرف دیگر، صنایع آبی‌پروری با تراکم بالا، وضعیت نامساعد و استرس‌زایی را برای موجود ایجاد می‌کند، که ممکن است به‌راحتی منجر به غلبه عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب بر این ماهیان ارزشمند گردد (Yang and Li, 2009). اقدامات معمول برای کنترل برخی از عوامل بیماری‌زا در مزارع پرورش ماهی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است (Ángeles Esteban, 2012). با این حال، استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به معرفی سویه‌های باکتریایی مقاوم به دارو شده است. به‌دلیل اینکه سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، دارای یک پلاسمید R قابل انتقال هستند، درمان عفونت‌ها اغلب با موفقیت کمتری همراه است (Akinbowale et al., 2006). علاوه بر این، انتقال ژن‌های مقاوم در بین باکتری‌ها می‌تواند برای سلامت انسان نیز خطرناک باشد (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). آئروموناس‌های متحرک فلور طبیعی آب، سطح پوست، آبشش و رودی بسیاری از ماهیان آب شیرین می‌باشند و به‌نظر می‌رسد با کاهش مقاومت بدن تحت شرایط استرس ایجاد شده، ماهیان را مورد هجوم قرار می‌دهند. تراکم بالا، تغییرات شدید درجه حرارت، دستکاری بیش از حد، حمل و نقل، کاهش اکسیژن، کمبودهای تغذیه‌ای و آلودگی‌های انگلی و قارچی در پوست زمینه‌ساز حمله آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد (Akhlaghi, 1999). تقریباً می‌توان ادعا نمود عفونت‌های ناشی از آئروموناس‌های متحرک از قبیل آئروموناس هیدروفیلا رایج‌ترین بیماری باکتریایی ماهیان آب شیرین می‌باشند (Akhlaghi, 1999; Aoki, 2010). مطالعات انجام شده در مورد این باکتری نشان می‌دهد که سموم همولیزین، آنتروتوکسین و سایر سموم در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارند. این باکتری در قزل‌آلای رنگین-کمان، قزل‌آلای قهوه‌ای، ماهی آزاد کوهو، مار ماهی، ماهیان خاویاری، کفال، ماهی طلایی و ماهیان آکواریومی ایجاد سپتی‌سمی هموراژیک می‌نماید (Akhlaghi and Vafaei, 2002; Austin, 2007). استرپتوکوکوس اینیایی، باکتری گرم مثبتی است که بیماری‌زایی آن با

مونیتورینگ کارگاه دریافت گردید (دما: 20.06 ± 0.85 , $T = 20.06 \pm 0.85$, ± 0.05 ، $pH=7.82$ ، لود باکتریایی: $(CFU/mL) 45/00 \pm 1633/33$).
روش بیسینچونینک اسید (BCA) جهت تعیین غلظت پروتئین نمونه‌های خام و فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت (Smith et al., 1985). این آزمون با استفاده از کیت تعیین غلظت SMART™ BCA Protein Assay kit، iNtRON و با استفاده از میکروپلیت اسپکتروفتومتر (Epoch) انجام شد.
جهت مشاهده و مقایسه کروماتوگرام نمونه‌های جمع‌آوری شده، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از هر نمونه تغلیظ شده به‌صورت جداگانه با یک برنامه مشابه (جدول ۲) به ستون C_{18} RP-HPLC (4.6 mm×250 mm Eurospher ساخت شرکت KNAUER آلمان تزریق شد. فرکشن‌های حاصل برحسب دو طول موج ۲۱۴ و ۲۸۰ نانومتر مانیتور و جمع‌آوری گردید (Su, 2011).

در شهر ساری نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های اولیه جهت انجام تست پایلوت نیز از کارگاه شهیدمرجانی استان گلستان تهیه گردید. موکوس ماهی به‌آرامی (به‌منظور تحریک تولید موکوس تازه) از ناحیه بین خط جانبی و باله پشتی بدون بیهوشی از سطح بدن ماهیان جمع-آوری گردید (John and Patterson, 2011). از موکوس ناحیه شکمی به‌دلیل احتمال آلودگی آن با ادرار و مواد دفعی روده استفاده نشد. نمونه‌ها سریعاً در دمای ۲۰- به آزمایشگاه منتقل و جهت حذف مواد جامد به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد (Su, 2011). در نهایت موکوس حاصل، به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور $12000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید (Hussin et al., 2017) و سوپرناتانت جهت مراحل بعدی در دمای ۲۰- نگهداری گردید.

برخی از پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب پرورش (آب چاه) از قبیل دما، pH، و بار باکتریایی آب اندازه‌گیری و برخی داده‌ها نیز از مرکز

جدول ۱- اطلاعات بیومتری فیل ماهیان مورد استفاده

| سن (سال) | طول (متر) Mean ±SD | وزن (کیلوگرم) Mean ±SD | فاکتور تیمار |
|----------|-----------------------|---------------------------|---------------|
| ≈ ۱ | ۰/۳۲ ± ۰/۰۴ | ۰/۴۰ ± ۰/۰۹ | گروه وزنی اول |
| ≈ ۲ | ۰/۶۲ ± ۰/۰۶ | ۴/۱۲ ± ۰/۸۷ | گروه وزنی دوم |
| ≈ ۸ | ۱/۵۰ ± ۰/۱۸ | ۴۲/۳۲ ± ۴/۳۷ | گروه وزنی سوم |

جدول ۲- برنامه مورد استفاده جهت مقایسه کروماتوگرام نمونه‌های موکوس سه رده سنی فیل ماهی

| # | زمان (دقیقه) | جریان (ml/min) | A (%) | B(ACN) (%) | C (%) | D (Water/TFA 0.05%) (%) |
|---|--------------|----------------|-------|------------|-------|-------------------------|
| ۱ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱۰۰ |
| ۲ | ۱۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱۰۰ |
| ۳ | ۹۰ | ۱ | ۰ | ۹۰ | ۰ | ۱۰ |
| ۴ | ۹۵ | ۱ | ۰ | ۹۰ | ۰ | ۱۰ |
| ۵ | ۱۰۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱۰۰ |

غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی انجام شد. باکترهایی مورد نظر در این آزمایش شامل سویه‌های *Streptococcus iniae* (PTCC1887) و *Aeromonas hydrophila* (ATCC7965) می-باشند که به‌ترتیب از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) و انستیتو پاستور ایران تهیه شد.
انتشار دیسک: تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد و مقایسه خصوصیت ضد میکروبی موکوس سه رده وزنی برطبق روش بائر و همکاران (Bauer et al., 1966) ضد باکتری آنروموناس هیدروفیلا و استرپتوکوکوس اینیایی مورد بررسی قرار گرفت. در این روش هر دیسک به ۲۰ میکروگرم پروتئین از هر نمونه آغشته و پس از ۲۴ ساعت هاله عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری و ثبت گردید.
تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)، کمترین غلظت باکتری-کشی (MBC): پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع مولر هینتون براث، به‌منظور مشاهده فعالیت ضدباکتریایی موکوس، کمترین غلظت

تعیین پروفایل جرم مولکولی پروتئین‌ها (SDS-PAGE): به‌منظور تعیین الگوی پراکندگی جرم مولکولی مجموعه پروتئینی موکوس از روش لاملی (Laemmli, 1970) با اندکی اصلاحات استفاده گردید. نمونه‌های موکوس در هر سه وزن (هر یک با دو تکرار) به نسبت حجمی ۴:۱ (لودینگ: نمونه) با لودینگ بافر (۵x) مخلوط، و پس از ۱۰ دقیقه جوشاندن بر روی ژل (ژل متراکم کننده: ۵ درصد، ژل تفکیک کننده: ۱۵ درصد) لود گردید. ژل به‌مدت ۱۰۰ دقیقه تحت شدت-جریان ۳۰ میلی‌آمپر (Mini electrophoresis system, BIORADR Laboratories, California) قرار گرفت. رنگ‌آمیزی به روش کوماسی (Coomassie Brilliant Blue R-250) به‌مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. مارکر پروتئینی (SMOBIO) با دامنه وزنی ۵-۲۴۵ kDa جهت تخمین جرم مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.
فعالیت ضد میکروبی: جهت مقایسه فعالیت ضد میکروبی موکوس فیل ماهی در رده‌های سنی مورد نظر، روش انتشار دیسک، کمترین

فرکشن در طول موج ۲۱۴ نانومتر) کاملاً یکسان و نمودار لگاریتمی زمان ماندگاری منطبق برهم و بدون هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بود در حالی‌که سطح زیر منحنی در فرکشن‌های ۲، ۵ و ۹ گروه‌های وزنی دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$).

زمان ماندگاری: مقایسه زمان ماندگاری فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی فاز معکوس سه گروه وزنی فیل‌ماهی کاملاً منطبق برهم و بدون هیچ تفاوت معنی‌داری بود ($R^2_1=R^2_2=R^2_3=0.99$). خروج هر فرکشن در زمان مشابه خروج همان فرکشن در سایر وزن‌ها نشان می‌دهد قدرت هیدروفوبیسیته پروتئین‌های مشابه موجود در سه نمونه نیز با افزایش وزن تغییری نداشته است (شکل ۲).

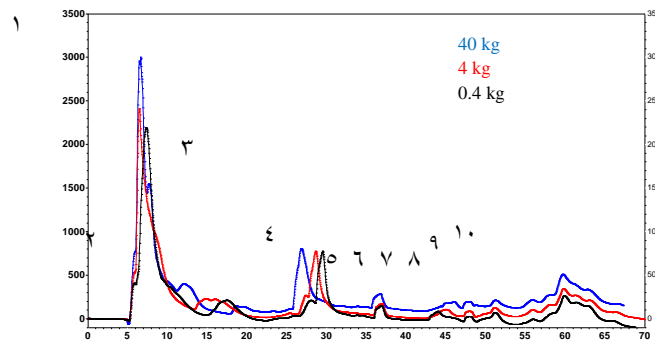
درصد سطح زیر منحنی: در بررسی سطح زیر منحنی فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی (جدول ۳)، سطح زیر منحنی در فرکشن‌های ۲، ۵ و ۹ گروه‌های وزنی دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$). در مقایسه فرکشن ۲، گروه وزنی سوم به‌طور معنی‌داری کمتر از دو وزن دیگر بود، درحالی‌که فرکشن ۵ و ۹، گروه وزنی اول به‌طور معنی‌داری کمترین مقدار را به‌خود اختصاص داد ($p \leq 0.05$).

بازدارندگی موکوس (MIC) نیز با روش رقت‌های متوالی میکرودیلوژن برای نمونه در چاهک‌های ۹۶ خانه در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت و سپس مشاهده‌میزان جذب نوری و کدورت، رشد یا عدم رشد باکتری بررسی گردید. چاهک فاقد کدورت به‌عنوان MIC گزارش شد. جهت آزمون MBC، مقدار ۵ درصد از چاهک‌های شفاف بر روی محیط کشت جامد کشت داده شد. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه انکوبه شد. در نهایت بالاترین رقتی که از ایجاد کلونی بر روی آگار ممانعت به‌عمل آورد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (Emmanuel *et al.*, 2015).

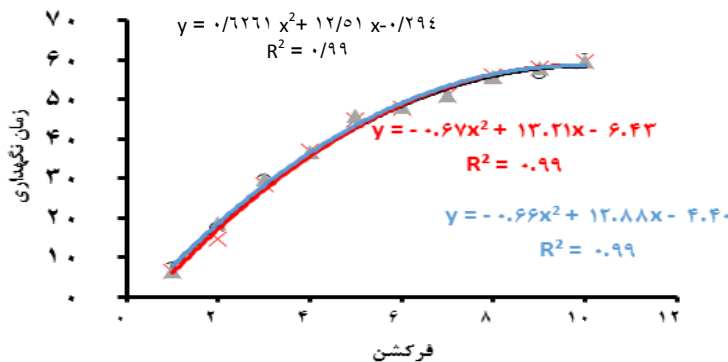
آنالیزهای آماری: طبقه‌بندی و آنالیز داده‌ها به‌کمک نرم افزارهای Excel-2016 و SPSS-18 انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان $\alpha = 0.05$ استفاده گردید.

۳ | نتایج

کروماتوگرافی فاز معکوس: مقایسه کروماتوگرافی موکوس سه گروه وزنی فیل‌ماهی در شکل ۱ ارائه گردیده است. کروماتوگرام حاصل از حجم و مقدار تزریقی یکسان، مشابه بودند. ، تعداد فرکشن‌ها (۱۰)



شکل ۱- مقایسه همپوشانی کروماتوگرام عصاره آبی موکوس سه گروه وزنی فیل‌ماهی



شکل ۲- مقایسه زمان ماندگاری فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی فاز معکوس سه گروهی وزنی فیل‌ماهی

جدول ۳- درصد سطح زیر منحنی فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی سه گروه وزنی موکوس فیل ماهی

| درصد سطح زیر منحنی (میانگین \pm انحراف معیار) | | | |
|---|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| گروه وزنی سوم | گروه وزنی دوم | گروه وزنی اول | |
| ۶۶ / ± ۸۳ ۱/۲۶ | ۶۴ / ± ۳۸ ۱/۷۰ | ۶۶ / ± ۴۱ ۱/۰۸ | فرکشن ۱ (مجموعه هیدروفیل) |
| ۳ / ± ۸۳ ۰/۷۰ ^b | ۶ / ± ۸۹ ۰/۳۵ ^a | ۶ / ± ۳۷ ۰/۵۸ ^a | فرکشن ۲ * |
| ۱۴ / ± ۰۸ ۰/۹۷ | ۱۴ / ± ۴۶ ۲/۰۰ | ۱۳ / ± ۶۳ ۱/۳۲ | فرکشن ۳ |
| ۲ / ± ۳۲ ۰/۵۵ | ۱ / ± ۹۸ ۰/۳۰ | ۱ / ± ۹۳ ۰/۲۰ | فرکشن ۴ |
| ۱ / ± ۵۰ ۰/۱۴ ^b | ۱ / ± ۳۵ ۰/۰۵ ^b | ۰ / ± ۶۴ ۰/۴۵ ^a | فرکشن ۵ * |
| ۰ / ± ۷۵ ۰/۰۶ | ۰ / ± ۸۰ ۰/۰۳ | ۰ / ± ۷۵ ۰/۱۰ | فرکشن ۶ |
| ۱ / ± ۶۸ ۰/۰۵ | ۱ / ± ۶۴ ۰/۲۱ | ۱ / ± ۶۶ ۰/۰۷ | فرکشن ۷ |
| ۰ / ± ۶۲ ۰/۰۴ | ۰ / ± ۵۹ ۰/۰۴ | ۰ / ± ۵۴ ۰/۰۷ | فرکشن ۸ |
| ۰ / ± ۳۱ ۰/۰۶ ^b | ۰ / ± ۳۵ ۰/۰۶ ^b | ۰ / ± ۰۸ ۰/۰۲ ^a | فرکشن ۹ * |
| ۸ / ± ۰۱ ۰/۰۶ | ۷ / ± ۸۹ ۰/۱۸ | ۸ / ± ۲۴ ۰/۶۳ | فرکشن ۱۰ |

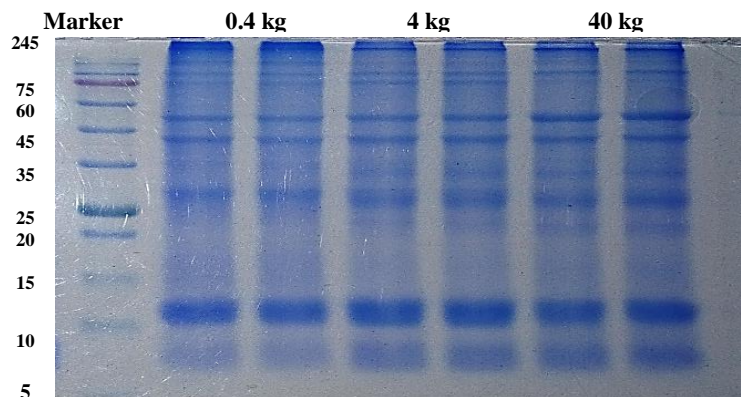
* تفاوت معنی‌دار بین سه گروه وزنی ($p \leq 0/05$)میانگین \pm انحراف معیار

SDS-PAGE گروه‌های وزنی نتایج مشابهی را در تعداد باندهای مشاهده شده در دامنه‌ی وزن مولکولی ۲۴۵-۵ کیلودالتون نشان داد. اما تفاوت‌های اندکی در میزان بیان برخی باندها بین گروه‌های وزنی مشاهده شد. سطح بیان پایین‌ترین وزن مولکولی (≈ 7 کیلودالتون) باندهای موجود با اختلاف اندکی وابستگی به وزن را در شدت بیان نشان دادند (شکل ۳).

مقایسه غلظت پروتئین: در بررسی مقایسه غلظت پروتئین کل موکوس هیچ تفاوت معنی‌داری بین سه گروه وزنی مشاهده نشد (به ترتیب: $0/03 \pm 0/02$ ، $0/04 \pm 0/01$ ، $0/02 \pm 0/02$ میکروگرم بر میکرولیتر)، در حالی که در مقایسه غلظت پروتئین فرکشن‌های حاصله در فرکشن ۴ در وزن‌های مختلف تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. گروه وزنی سوم مقدار بالاتری پروتئین را نشان داد (جدول ۴). خروجی ژل

جدول ۴- غلظت پروتئین فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی موکوس سه گروه وزنی فیل ماهی

| غلظت پروتئین (میکروگرم بر میکرولیتر) (میانگین \pm انحراف معیار) | | | |
|---|------------------------------|------------------------------|-----------|
| گروه وزنی سوم | گروه وزنی دوم | گروه وزنی اول | |
| ۱/۴۲ \pm ۰/۰۳ | ۱/۴۲ \pm ۰/۱۹ | ۱/۳۹ \pm ۰/۱۴ | فرکشن ۱ |
| ۰/۱۴ \pm ۰/۰۰ | ۰/۱۲ \pm ۰/۰۱ | ۰/۱۱ \pm ۰/۰۱ | فرکشن ۲ |
| ۰/۰۷ \pm ۰/۰۱ | ۰/۰۸ \pm ۰/۰۰ | ۰/۰۷ \pm ۰/۰۰ | فرکشن ۳ |
| ۱/۱۷ \pm ۰/۰۱ ^b | ۱/۰۹ \pm ۰/۰۱ ^a | ۱/۰۹ \pm ۰/۰۲ ^a | فرکشن ۴ * |
| ۰/۸۶ \pm ۰/۰۰ | ۰/۸۵ \pm ۰/۰۱ | ۰/۸۴ \pm ۰/۰۸ | فرکشن ۵ |
| ۰/۳۱ \pm ۰/۰۰ | ۰/۳۱ \pm ۰/۰۰ | ۰/۳۰ \pm ۰/۰۱ | فرکشن ۶ |
| ۰/۰۹ \pm ۰/۰۱ | ۰/۱۰ \pm ۰/۰۰ | ۰/۱۱ \pm ۰/۰۰ | فرکشن ۷ |
| ۰/۳۷ \pm ۰/۰۲ | ۰/۳۵ \pm ۰/۰۱ | ۰/۳۳ \pm ۰/۰۳ | فرکشن ۸ |
| ۰/۰۹ \pm ۰/۰۱ | ۰/۱۰ \pm ۰/۰۱ | ۰/۰۸ \pm ۰/۰۱ | فرکشن ۹ |
| ۰/۸۱ \pm ۰/۰۲ | ۰/۸۰ \pm ۰/۰۱ | ۰/۸۳ \pm ۰/۰۳ | فرکشن ۱۰ |

* وجود تفاوت معنی‌دار بین سه گروه وزنی ($p \leq 0/05$)

شکل ۳- SDS-PAGE موکوس خام سه گروه وزنی (دوتکرار)

مقادیر کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی، تمام گروه‌ها پس از گذراندن ۴۸ ساعت انکوباسیون، هم در گروه‌های وزنی مختلف و هم در مقایسه دو باکتری باهم، همچنان دارای مقادیر MIC و MBC یکسان بودند ($MBC_{48} = MIC_{48}$ میکروگرم) (جدول ۶).

در تست انتشار دیسک، موکوس هر سه گروهی وزنی فعالیت ضد-باکتریایی مشابهی را در برابر *A. hydrophila* نشان دادند در حالی که در مواجهه با *S. iniae* گروه وزنی اول (۰/۴ کیلوگرم) به‌طور معنی‌داری هاله عدم رشد کمتری را نشان داد ($p \leq 0.05$) (جدول ۵). کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) و باکتری‌کشی (MBC): در بررسی فعالیت ضدباکتریایی موکوس خام سه رده وزنی جهت تعیین

جدول ۵- مقایسه قطر هاله عدم رشد نمونه‌های موکوس سه رده وزنی فیل ماهی در برابر استرپتوکوکوس اینیایی (الف) و آئروموناس هیدروفیلا (ب)

| هاله عدم رشد (میلی‌متر) (میانگن \pm انحراف معیار) | | | | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| باکتری / تیمار | گروه وزنی اول | گروه وزنی دوم | گروه وزنی سوم | آنتی بیوتیک (CRO) |
| آئروموناس هیدروفیلا | $11/16 \pm 0/28^a$ | $12/00 \pm 0/00^a$ | $11/76 \pm 1/42^a$ | $17/80 \pm 0/65^b$ |
| استرپتوکوکوس اینیایی | $12/03 \pm 0/95^a$ | $15/40 \pm 0/52^b$ | $15/63 \pm 0/77^b$ | $29/30 \pm 0/62^c$ |

جدول ۶- مقادیر MIC و MBC موکوس خام گروه‌های مختلف وزنی در برابر باکتری *S. iniae* و *A. hydrophila*

| تیمار | آزمون | آئروموناس هیدروفیلا | استرپتوکوکوس اینیایی |
|-------------------|------------------------------|---------------------|----------------------|
| گروه وزنی اول | MIC ₄₈ (میکروگرم) | ۲۵ | ۲۵ |
| | MBC ₄₈ (میکروگرم) | ۲۵ | ۲۵ |
| گروه وزنی دوم | MIC ₄₈ (میکروگرم) | ۲۵ | ۲۵ |
| | MBC ₄₈ (میکروگرم) | ۲۵ | ۲۵ |
| گروه وزنی سوم | MIC ₄₈ (میکروگرم) | ۲۵ | ۲۵ |
| | MBC ₄₈ (میکروگرم) | ۲۵ | ۲۵ |
| آنتی بیوتیک (CRO) | MIC ₄₈ (میکروگرم) | ۱۲/۵ | ۱۲/۵ |
| | MBC ₄₈ (میکروگرم) | ۲۵ | ۲۵ |

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

موکوس اپیدرم ماهی حاوی اجزای ایمنی ذاتی است و به‌عنوان اولین سد ایمنی بدن تعریف می‌شود. موکوس به‌طور مداوم ترشح می‌شود و تعادل در میزان ترشح و تخریب و دفع آن، ضخامت موکوس را تعیین می‌کند (Cone, 2009). سازگاری این سیستم با تنش‌های مختلف محیطی و حتی تغییرات متناوب سن یا وزن اغلب برای جاندار سودمند تلقی می‌شود زیرا این قدرت در سازگار شدن با محیط می‌تواند برای بقای هر ارگانیسم بسیار حائز اهمیت باشد (Meyer and Bullock, 1973, Dudley et al., 1980). با این حال، برخی از عوامل نامساعد ماهی را در شرایطی چالش برانگیز قرار می‌دهند که منجر به اختلال در عملکرد سد موکوسی می‌شود. باوجود این، برخی از تغییرات نیز منجر به بازخورد مؤثر در ماهی می‌شوند. پروژه حاضر مطابق فرضیه بالاترین فعالیت ضدباکتریایی در سنین پایین، فعالیت متوسط برای سنین میانسالی و کمترین آن برای سن مولد به‌ترتیب با توجه سیستم ایمنی ناقص، وضعیت تثبیت شده و صرف بیشتر انرژی جهت آمادگی تکثیر طراحی شد. در تأیید فرض اولیه این تحقیق میزان پروتئین کل بیشتر در موکوس دیسکس مولد ($0/3 \pm 0/73$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به موکوس ماهیان جوانتر ($0/1 \pm 0/63$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) توسط محققین پیشین گزارش شده است (Chong et al., 2005) که

می‌توان آن را به تغییر وضعیت ماهی و نیز رفتار تغذیه‌ای لاروها از از ترشحات موکوسی والدین نسبت داد. در حالی که، غلظت نمونه‌های خام در مطالعه حاضر ($W_1 = 1/02 \pm 0/02$ میکروگرم بر میکرولیتر) تفاوت معنی‌داری نداشت. امروزه، ماهی از منابع بالقوه زیست فعال در نظر گرفته می‌شود (Pomponi, 1999). اغلب ترکیبات فعال زیستی مانند پپتیدها، که خواص درمانی آن به اثبات رسیده است، از طریق هیدرولیز عضله ماهی توسط آنزیم‌ها به‌دست می‌آیند (Ryan et al., 2011, Najafian and Babji, 2012). محصول هیدرولیز عضله در مقایسه با موکوس اپیدرم که به‌عنوان یک لایه خارجی تجدیدپذیر است، حاوی مقادیر قابل توجهی پروتئین است. با این حال پروتئین تولید شده در موکوس علی‌رغم غلظت به نسبت پایین‌تر، همچنان برای ارگانیسم بسیار مؤثر است زیرا موکوس به‌طور مداوم ترشح و جایگزین شده و از چسبندگی، استقرار و تهاجم پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کند (Arasu et al., 2013).

پروتئین بیش از ۸۵ درصد از ماده خشک موکوس اپیدرمی را تشکیل می‌دهد (Ángeles Esteban, 2012). پاتوژن‌ها و سایر مواد مشکل‌ساز می‌توانند تولید و ترشح موکوس را به‌طور چشمگیری تحریک کنند (Cone, 2009) یا باعث تغییر الگوی ترشح پروتئین

و حشی و پرورشی آب شور و شیرین در جهان و مشترک با انسان که در ماهیان خاویاری منطقه آدریاتیک نیز گزارش شده است، نسبت به آئروموناس هیدروفیلا (*A. hydrophila*)، به عنوان نماینده باکتری‌های گرم منفی و رایج‌ترین عامل بیماری‌زای آبی پروری، به طور میانگین عدم هاله رشد بالاتری را نشان دادند. مقایسه بین گروه‌های وزنی فعالیت ضد باکتریایی مشابهی را در برابر *A. hydrophila* نشان داد در حالی که در مقایسه بین گروه‌های وزنی، وزن اول، به طور معنی‌داری نسبت به دو وزن دیگر هاله عدم رشد کمتری را در برابر *S. iniae* نشان داد ($p \leq 0.05$). ماهیت شیمیایی موکوسی که توسط سلول‌های جامی تولید می‌شود، در خلال دگرذیسی نوزادی یا در اثر مواجهه ماهی با مواد سمی یا در خلال سایر تغییرات محیطی مانند تغییر شوری، تغییر می‌کند اما از آنجا که در این تحقیق تفاوتی در ساختار یا تعداد باندهای پروتئینی مشاهده نشد این اثرات مهاری را می‌توان به سطح بیان پپتید (الگوی ژل الکتروفورز) در گروه اول و نیز دخیل بودن این پپتید در مواجهه و موفقیت در مقابله با باکتری گرم مثبت دانست که کمبود آن نقش چندانی در مقابله با باکتری گرم منفی نداشته است. در تحقیقات بسیاری افزایش بیان ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی کم در موکوس اپیدرمی ماهی در مواجهه با استرس میکروبی مشاهده شده است اما در این تحقیق میانگین لود باکتریایی محیط پرورش در گروه‌های وزنی تفاوت معنی‌داری نداشتند. ماهی‌ها پروتئین‌های ضد-باکتریایی و پپتیدهایی را ترشح می‌کنند که قادر به نفوذ در غشای سلول‌های هدف و از بین بردن باکتری‌ها با تشکیل منافذ بزرگ در غشای آنها هستند (Ebran *et al.*, 1999; Balakumar *et al.*, 2011; Sasidharan *et al.*, 2011). خواص ضد باکتریایی موکوس اپیدرم ماهی در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Esteve-Gassent *et al.*, 2003; Kuppalakshmi *et al.*, 2008, Wei *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2011; Vennila *et al.*, 2011; Haniffa *et al.*, 2014). علی‌رغم مشاهده اختلاف معنی‌دار در هاله عدم رشد بین گروهی (مقایسه میانگین کل هاله عدم رشد در برابر استرپتوکوکوس اینیایی و آئروموناس هیدروفیلا) و درون گروهی (مقایسه بین گروه‌های وزنی در مواجهه با هر باکتری)، در تعیین کمترین مقادیر بازدارندگی و باکتری‌کشی، در این مطالعه، همه گروه‌های وزنی فعالیت ضد میکروبی مشابهی را در برابر *A. hydrophila* و *S. iniae* نشان دادند. به‌گونه‌ای که هیچ تفاوتی در مقادیر کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی پس از ۴۸ ساعت ($MBC_{48} = MIC_{48}$ میکروگرم) سه گروه و حتی نسبت به باکتری دیگر هم وجود نداشت. از این رو می‌توان نتیجه گرفت دیسک احتمالاً از آزاد شدن یکی از مواد مؤثر در مقابله با باکتری گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا جلوگیری کرده است و قدرت انتشار ماده مؤثره را سلب کرده است. در نهایت می‌توان بیان کرد MIC روش دقیق‌تری برای مقایسه فعالیت ضد میکروبی موکوس بوده است. باتوجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه غلظت پروتئین، الگوی پروتئین در SDS-PAGE، کروماتوگرام و فعالیت ضد میکروبی، می‌توان بیان نمود که از نظر ایمنی اولیه، گروه وزنی اول (یعنی ۰/۴ کیلوگرم) به سطح تکاملی

گردند. چانگ و همکاران (Chong *et al.*, 2005) نشان دادند که الگوی الکتروفورز مجموعه پروتئینی موکوس ماهی مولد و ماهیان جوان تقریباً مشابه بود با این حال میزان بیان برخی پروتئین‌ها دارای تفاوت بود (Chong *et al.*, 2005). به‌طور مشابه، SDS-PAGE در مطالعه حاضر، جمعیت پروتئینی در دامنه ۵ تا ۲۴۵ کیلودالتون نیز تفاوت معنی‌داری را در الگوی پروتئینی سه وزن مورد بررسی نشان نداد. با این وجود، تفاوت اندکی در بیان یک باند پپتیدی با وزن تقریبی ۷ کیلودالتون در گروه اول در مقایسه با گروه‌های دیگر مشاهده گردید. مشاهده مشابهی در تعداد فرکشن‌های تفکیک شده و مدت زمان نگهداری آنها از کروماتوگرام‌های RP-HPLC سه گروه وزنی مشاهده شد. این شباهت را می‌توان به منبع ژنتیکی با تنوع پایین و شرایط پرورش مشابه (منبع تغذیه، کیفیت آب و بار باکتریایی) برای همه گروه‌های مورد استفاده نسبت داد. به‌نظر می‌رسد با حذف متغیرهای اثرگذار خارجی در تیمارها و شرایط یکسان، فیل‌ماهی به‌طور ذاتی در این دامنه سنی دارای سیستم ایمنی موکوسی باثبات و غیروابسته به سن یا وزن می‌باشد. تاکنون هیچ گزارش مستندی در مورد کروماتوگرام موکوس اپیدرم در مراحل مختلف زندگی ماهیان خاویاری گزارش نشده است. در بررسی کروماتوگرام سه گروه وزنی فیل‌ماهی، تعداد فرکشن‌ها (۱۰ فرکشن در طول موج ۲۱۴ نانومتر) کاملاً یکسان و نمودار لگاریتمی زمان ماندگاری منطبق بر هم و بدون هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بود در حالی که سطح زیر منحنی در فرکشن‌های ۲، ۵ و ۹ دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$). باتوجه به اختلافات اندک در گروه‌های وزنی مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل کروماتوگرام و مؤلفه‌های آن به‌عنوان یک روش حساس‌تر از الکتروفورز برای مقایسه پروفایل‌ها پیشنهاد می‌شود.

علاوه بر سد مکانیکی، عوامل دفاعی مختلفی از جمله ایمونو-گلوبولین، پروتئین واکنشی C، لکتین، لیزوزیم، همولیزین و پپتیدهای ضد میکروبی در موکوس پوست ماهیان کشف شده است (Sharon and Lis, 1972; Barondes, 1988; Alexander and Ingram, 1992; Shephard, 1994; Cole *et al.*, 1997, Cone, 2009). بیشتر باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان را باکتری‌های گرم منفی و تعداد کمتری از آنها را باکتری‌های گرم مثبت تشکیل می‌دهند. مطالعات متعددی فعالیت ضد باکتریایی موکوس ماهی در برابر عوامل بیماری‌زای عفونی رایج را بررسی کرده‌اند (Bergsson *et al.*, 2005; Subramanian *et al.*, 2008; John and Patterson, 2011). گونه‌های بیماری‌زا دارای یک لایه S در دیواره سلولی و توانایی تولید بیشتر الاستاز هستند، لیکن ارتباط بسیاری میان بیماری‌زایی و آگزوتوکسین‌های پروتئاز و همولیزین وجود ندارد (Aoki, 2010). فعالیت مهاری موکوس نیز اغلب علیه باکتری‌های گرم مثبت گزارش شده است و برخی از مطالعات گزارش می‌کنند که فعالیت مهاری موکوس در برابر باکتری‌های گرم منفی بسیار ضعیف است (Gobinath and Ravichandran, 2011). در اثبات این فرضیه، در مطالعه حاضر نیز، موکوس در مواجهه با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (*S. iniae*) به‌عنوان نماینده باکتری‌های گرم مثبت و عامل بیماری برگشت‌پذیر تعداد بسیاری از ماهیان

- single disk method. American journal of clinical pathology, 45(4-ts):493-6.
- Bergsson G., Agerberth B., Jörnvall H., Gudmundsson G.H. 2005. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). The FEBS journal, 272(19):4960-9.
- Bragulla H.H., Homberger D.G. 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. Journal of anatomy, 214(4):516-59.
- Brogden N.K., Brogden K.A. 2011. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? International journal of antimicrobial agents, 38(3):217-25.
- Bronzi P., Rosenthal H., Gessner J. 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. Journal of Applied Ichthyology, 27(2):169-75.
- Carmona R., Domezain A., García-Gallego M., Hernando JA., Rodríguez F., Ruiz-Rejón M. 2009. Biology, conservation and sustainable development of sturgeons, Springer Netherlands.
- Cheng S., Hu Y.H., Jiao X.D. Sun L. 2010. Identification and immunoprotective analysis of a *Streptococcus iniae* subunit vaccine candidate. Vaccine, 28(14): 2636-2641.
- Chong K., Ying T.S., Foo J., Jin L.T., Chong A. 2005. Characterisation of proteins in epidermal mucus of discus fish (*Symphysodon* spp.) during parental phase. Aquaculture, 249(1-4):469-76.
- Cole A.M., Weis P., Diamond G. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. Journal of Biological Chemistry, 272(18):12008-13.
- Cone R.A. 2009. Barrier properties of mucus. Advanced drug delivery reviews, 61(2):75-85.
- Dudley D.J., Guentzel M.N., Ibarra M., Moore B., Sagik B. 1980. Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. Applied and Environmental Microbiology, 39(1):118-26.
- Dumont L. 1988. Way of life: King, householder, renouncer: Essays in honour of Louis Dumont: Motilal Banarsidass Publishes.
- Ebran N., Julien S., Orange N., Saglio P., Lemaître C., Molle G. 1999. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 122(2):181-9.
- Eldar A.A. Ghittino C. 1999. Lactococcus garvieae and Streptococcus iniae infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Diseases of aquatic organisms, 36(3): 227-231.
- Ellis A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental & Comparative Immunology, 25(8): 827-839.
- Esteve-Gassent M., Nielsen M.E., Amaro C. 2003. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*: development of a new method for antibody quantification in skin mucus. Fish & shellfish immunology, 15(1):51-61.
- هم‌سطح وزن‌های بالاتر (یعنی ۴ و ۴۰ کیلوگرم) رسیده است. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی برای مشاهده تفاوت‌های احتمالی این تفاوت ساختاری و عملکردی موکوس در صورت دسترسی، دامنه‌وزنی وسیع‌تری مورد بررسی قرار گیرد.
- پست الکترونیک نویسندگان**
- F.khani88@gmail.com
فاطمه خانی:
- ahajimoradloo@yahoo.com
عبدالمجید حاجی مرادلو:
- rasulghorbani@gmail.com
رسول قربانی:
- shahbazzade@yahoo.com
دلاور شهباززاده:
- kamranpb@gmail.com
کامران پوشنگ باقری:
- REFERENCES**
- Agnew W., Barnes A.C. 2007. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Veterinary microbiology, 122(1-2): 1-15.
- Akbari R., Vala M.H., Hashemi A., Aghazadeh H., Sabatier J.M., Bagheri K.P. 2018. Action mechanism of melittin-derived antimicrobial peptides, MDP1 and MDP2, de novo designed against multidrug resistant bacteria. Amino acids, 50(9):1231-43.
- Akhlaghi M. 1999. Effect of stress in occurrence of *Aeromonas hydrophila* infection in cultured carp. Iranian Journal of Fisheries Science, 7: 1-8. (In Persian).
- Akhlaghi M., Vafaei S. 2002. Patogenicity of *Aeromonas hydrophila* infection in aquarium fish. Iranian Journal of Veterinary Research, 1: 82-87. (In Persian).
- Akinbowale O.L., Peng H., Barton M. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. Journal of Applied Microbiology, 100(5):1103-13.
- Alexander J.B., Ingram G.A. 1992. Non-cellular nonspecific defense mechanisms of fish. Annual Review of Fish Diseases, 2:249-79.
- Ángeles Esteban M. 2012. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. ISRN Immunology, 15:1-29.
- Aoki T. 2010. Motile aeromonas (*Aeromonas hydrophila*). In: Fish Disease and Disorders, Vol. 3, Woo, P. T. K. and Bruno, D. W. (eds.) 2nd edition. CABI Publishing, UK.
- Arasu A., Kumaresan V., Sathyamoorthi A., Palanisamy R., Prabha N., Bhatt P. 2013. Fish lily type lectin-1 contains β -prism architecture: Immunological characterization. Molecular immunology, 56(4):497-506.
- Austin B. McIntosh D. 1988. Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases, 11(3): 275-277.
- Barondes SH. 1988. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. Trends in biochemical sciences, 13(12):480-2.
- Bauer A., Kirby W., Sherris J.C., Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized

- Gobinath R.A.C., Ravichandran S. 2011. Antimicrobial peptide from the epidermal mucus of some estuarine catfishes. *World Applied Science Journal*, 12:256-60.
- Hancock R.E. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet infectious diseases*, 1(3):156-64.
- Haniffa M.A.K., Sheela P.A.J., Kavitha K., Jais A.M.M. 2014. Salutary value of haruan, the striped snakehead *Channa striatus*—a review. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4:S8-S15.
- Hansen G., Olafsen J. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold-water fish. *Microbial ecology*, 38(1):1-26.
- Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Mojazi Amiri B., Rostami H.K., Merrifield D. 2011. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 17(5):498-504.
- Hussin N.M., Shaarani S.M., Sulaiman M.R., Ahmad A.H., Vairappan C.S. 2017. Chemical composition and antioxidant activities of catfish epidermal mucus. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 4(1): 26-34.
- Jalali M.A., Ahmadifar E., Sudagar M., Takami G.A. 2009. Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. *Aquaculture Research*, 40(7):804-9.
- John S., Patterson J. 2011. Antibacterial activity of epidermal layer of fishes against human pathogens. *Indian Journal of Fisheries*, 58(4):87-90.
- Khodorevskaya R.P., Dovgopol G.F., Zhuravleva O.L., Vlasenko A.D. 1997. Present status of commercial stocks of sturgeons in the Caspian Sea basin. *Sturgeon biodiversity and conservation*: Springer, pp: 209-19.
- Kumari R., Kaur I., Bhatnagar A. 2011. Effect of aqueous extract of *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner on growth, yield and quality of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Journal of Applied Phycology*, 23(3):623-33.
- Kuppulakshmi C., Prakash M., Gunasekaran G., Manimegalai G., Sarojini S. 2008. Antibacterial properties of fish mucus from. *European review for medical and pharmacological sciences*, 12:149-53.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680.
- Lazado C.C., Caipang C.M.A. 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology*, 39(1):78-89.
- Meyer F., Bullock G. 1973. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied microbiology*, 25(1):15-25.
- Moghim M., Kor D., Tavakolieshkalak M., Khoshghalb M. 2006. Stock status of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) along the Iranian coast of the Caspian Sea. *Journal of applied Ichthyology*, 22:99-107.
- Najafian L., Babji A.S. 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33(1):178-85.
- Nazari R., Makhdoumi C., Naghavi A. 2009. Effect of temperature on the growth and maturity of beluga (*Huso huso*). *Journal of New technologies in the development of aquaculture (fisheries)*, 3(1): 1-8.
- Pomponi S.A. 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *Progress in Industrial Microbiology*, (35):5-13.
- Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C. 2011. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3(9):765-91.
- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K., Latha L.Y. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1): 36-43.
- Schwarz S., Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary research*, 32(3-4):201-25.
- Sharon N., Lis H. 1972. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, 177(4053):949-59.
- Shephard K.L. 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in fish biology and fisheries*, 4(4):401-29.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M. 1985. Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1):76-85.
- Soltani M. 2008. *Immunology of Fish and Crustaceans*. Tehran University Publications. 80p. (In Persian).
- Soltani M., Jamshidi S., Sharifpour I. 2005. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25(3):95-106.
- Su Y. 2011. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158(2): 149-154.
- Subramanian S., Ross N., MacKinnon S. 2008. Comparison of the biochemical composition of normal epidermal mucus and extruded slime of hagfish (*Myxine glutinosa* L.). *Fish & shellfish immunology*, 25(5):625-32.
- Tasumi S., Yang W.J., Usami T., Tsutsui S., Ohira T., Kawazoe I. 2004. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(4):325-35.
- Vennila R., Kumar K.R., Kanchana S., Arumugam M., Vijayalakshmi S., Balasubramaniam T. 2011. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingrays. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2):S239-S43.
- Wedemeyer G.A., McLeay D., Goodyear C. 1984. Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: the problems and methods of monitoring. *Contaminant Effects on Fisheries*, pp: 164-195.
- Wei O.Y., Xavier R., Marimuthu K. 2010. Screening of antibacterial activity of mucus extract of snakehead fish, *Channa striatus* (Bloch). *European Review for*

Medical and Pharmacological Science, 14(8):675-81.
Yang W., Li A. 2009. Isolation and characterization of
Streptococcus dysgalactiae from diseased *Acipenser
schrenckii*. Aquaculture, 294(1-2):14-7.

نحوه استناد به این مقاله:

خانی ف.، حاجی مرادلو ع.، قربانی ر.، شهباززاده د.، پوشنگ باقری ک. ۱۴۰۱.
مقایسه پروفایل و فعالیت ضد میکروبی موکوس اپیدرم فیل ماهی (*Huso huso*
Linnaeus 1758) در رده‌های وزنی مختلف. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی
کاربردی، ۱۰(۱): ۴۶-۵۶. <https://doi.org/10.22034/jair.10.1.51>

Khani F., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Shabbazzadeh D.,
Pooshang Bagheri K. 2022. Comparison of profile and
antimicrobial activity of giant sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus,
1758) epidermal mucus in different weight groups. Journal of
Applied Ichthyological Research, 10(1): 46-56.
<https://doi.org/10.22034/jair.10.1.51>

Comparison of profile and antimicrobial activity of giant sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus, 1758) epidermal mucus in different weight groups

Khani F¹., Hajimoradloo A^{1*}., Ghorbani R¹., Shahbazzadeh D²., Pooshang Bagheri K².

¹ Fisheries Dept., Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

² Biotechnology Research Center, Dept., of Medical Biotechnology, Venom and Biomolecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Type:

Original Research Paper

<https://doi.org/10.22034/jair.10.1.51>

Paper History:

Received: 30-08-2021

Accepted: 15-11- 2021

Corresponding author:

Hajimoradloo A. Fisheries Dept., Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email: ahajimoradloo@yahoo.com

Abstract

In addition to mucus physical functions such as reducing water friction and protecting against abrasion, it contains biologically active constituents, which is the first line of defense against pathogens. In the present study, some properties of proteins in the epidermal mucus (*Huso huso*) as one of the native species of the southern coast of the Caspian Sea were evaluated. In this study, mucus was directly collected from fish surface in three different weight classes (0.4, 4 and 40 kg) and some properties such as total protein concentration, chromatogram (RP-HPLC) and molecular mass profile of mucus proteins in three weight classes were compared. Antimicrobial activity of mucus was evaluated by disk diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The crude samples of different weights showed no significant difference in protein concentration (1.02 ± 0.03 , 1.04 ± 0.01 , 1.07 ± 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively) but HPLC fraction No.4 in the third weight (40kg) showed a significant higher concentration in comparison to others ($\alpha=0.05$). SDS-PAGE results revealed that the mucus samples contain peptides and proteins ranging from 5 kDa to 245 kDa with no considerable differences. All chromatograms showed similar numbers of fractions at similar retention time while the area percentage of fractions underwent significant differences in fractions 2, 4 and 9 ($\alpha=0.05$). Disk diffusion showed the same antibacterial activity against *A. hydrophila* while group 1 (0.4 kg) had a significantly lower inhibition zone against *S. iniae*. All the samples possessed the same antimicrobial activity in MIC and MBC assays ($\text{MIC}_{48}=\text{MBC}_{48}=25$ μg). The current study revealed that all selected weight groups had the same properties in HPLC chromatogram and SDS-PAGE. Comparison of antimicrobial activity in MIC and MBC tests showed no significant difference between groups faced to *A. hydrophila* and *S. iniae*, while in the disk diffusion test, there were significant differences in *S. iniae*. Therefore, this difference could refer to the test competency. In conclusion, it can be suggested that in terms of protection (non-specific immunity), the first weight group (i.e. ≈ 0.4 kg) reached an evolutionary level as well as higher weights did (i.e. ≈ 4 and 40 kg).

Keywords: Milk shark, The Persian Gulf, Oman Sea, Growth modelling