نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی
Journal homepage: http://jair.gonbad.ac.ir
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه گنبد کاووس

# مقایسه پروفایل و فعالیت ضدمیکروبی موکوس اپیدرم فیل‌ماهی (*Huso huso* ,Linnaeus 1758) در رده‌های وزنی مختلف

فاطمه خانی[1]، عبدالمجید حاجی‌مرادلو*[1]، رسول قربانی[1]، دلاور شهباززاده[2]، کامران پوشنگ باقری[2]
[1] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[2] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

**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

**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 فیل‌ماهی (*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 ضدمیکروبی 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 (به‌ترتیب : ۰/۰۳ ± ۱/۰۲، ۰/۰۱ ± ۱/۰۴، ۰/۰۲ ± ۱/۰۷ میکروگرم بر میکرولیتر) درحالی‌که 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 حالی‌که سطح زیر منحنی در فرکشن‌های ۲، ۵ و ۹ گروه‌های وزنی دارای تفاوت معنی‌دار 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 درحالی‌که 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 گروه های وزنی دارای مقادیر MIC و MBC یکسان بودند ($MIC_{48} = MBC_{48} = 25$ میکروگرم) در حالی‌که 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:***
**فیل‌ماهی (*Huso huso*)، موکوس، فعالیت ضدمیکروبی، کروماتوگرافی فاز معکوس**

## ۱ | مقدمه

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). علاوه‌بر 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 گلیکوپروتئین، پروتئوگلیکان و پروتئین‌هاست که به‌صورت یک سد فیزیکی و شیمیایی عمل می‌کند و علاوه‌بر نقش محافظتی فیزیکی، حاوی ترکیبات ترشحی متنوعی از جمله آگلوتینین‌ها، لیزین‌ها، لیزوزیم‌ها، مواد رسوب‌دهنده غیراختصاصی، پروتئین فاز حاد و آنتی بادی‌های 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



[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

(Dumont, 1988) است و به‌عنوان زیستگاه گونه های 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 گونه های ماهیان خاویاری از جمله فیل‌ماهی، به دلیل صید بیش از حد، از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی، تخریب بستر تخم‌ریزی و هچری‌ها 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 آبزی‌پروری 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 آنتی بیوتیک‌ها است (Ángeles Esteban, 2012). با این حال، استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها منجر به معرفی سویه‌های باکتریایی مقاوم به دارو شده است. به‌دلیل اینکه سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، دارای یک پلاسمید R قابل انتقال هستند، درمان عفونت-ها 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 روده‌ی بسیاری از ماهیان آب شیرین می باشند 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 بیماری‌زائی آن با علائمی چون بیرون‌زدگی چشم، زخم‌های سطحی در باله و آبشش ماهیان و زخم در ناحیه دست و پاهای انسان همراه است. زئونوز 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 Ghittino, 1999; Cheng *et al*., 2010; Soltani *et al*., 2005) و 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 بیماری‌می-باشند 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 قرارگیرد. در مواجهه با بیماری‌ها، موکوس اپیدرم می تواند به‌عنوان یک عامل اصلی در سلامتی ماهی درنظر گرفته شود و به‌عنوان اولین خط سیستم ایمنی بدن ایجاد سد فیزیکی یا شیمیایی پایدار در برابر عوامل بیماری-زای مهاجم عمل کند. پروتئین‌های ضدمیکروبی و پپتیدها از جمله مؤثرترین عوامل ایمنی موکوسی هستند و نقش دفاعی طبیعی آنها ممکن است باعث هم افزایی 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 ضدمیکروبی 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 جبران ناپذیری 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 ضدمیکروبی 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

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

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 جمع‌آوری 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 g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد (Su, 2011). در نهایت موکوس حاصل، به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور *g** ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید (Hussin *et al*., 2017) و سوپرنتانت 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 مونیتورینگ کارگاه دریافت گردید (دما: ۰/۸۵ ± ۲۰/۰۶ =T، ۰/۰۵ ± pH=۷/۸۲، لود باکتریایی: (CFU/mL) ۴۵/۰۰ ± ۱۶۳۳/۳۳).

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$^{TM}$ 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 جمع آوری گردید (Su, 2011).

**جدول۱- اطلاعات بیومتری فیل‌ماهیان مورد استفاده**

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

**جدول ۲- برنامه مورد استفاده جهت مقایسه کروماتوگرام نمونه‌های موکوس سه رده سنی فیل‌ماهی**

| # | 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 |

**تعیین پروفایل جرم مولکولی پروتئین‌ها (SDS-PAGE):** به‌منظور تعیین الگوی پراکندگی جرم مولکولی مجموعه‌پروتئینی 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 برروی ژل (ژل متراکم کننده : ۵ درصد، ژل تفکیک کننده: ۱۵ درصد) لود گردید. ژل به‌مدت ۱۰۰ دقیقه تحت شدت‌جریان ۳۰ میلی‌آمپر ( Mini electrophoresis system, BIORADR Laboratories, California) قرار گرفت. رنگ‌آمیزی به روش کوماسی (Coomassie Brillant Blue R-250) به‌مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. مارکر پروتئینی (SMOBIO) با دامنه وزنی kDa ۵-۲۴۵ جهت تخمین جرم مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

**فعالیت ضدمیکروبی:** جهت مقایسه فعالیت ضدمیکروبی موکوس فیل‌ماهی در رده‌های سنی موردنظر، روش انتشار دیسک، کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی انجام شد. باکترهایی مورد نظر در این آزمایش شامل سویه‌های *Streptococcus iniae* (PTCC1887) و *Aeromonas hydrophila* (ATCC7965) می‌باشند 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 ضدمیکروبی موکوس سه رده وزنی برطبق روش بائر و همکاران (Bauer *et al*., 1966) ضد باکتری آئروموناس 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 باکتری‌کشی(MBC):** پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت مایع مولرهینتون براث، به‌منظور مشاهده فعالیت ضدباکتریایی موکوس، کمترین غلظت

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

بازدارندگی موکوس (MIC) نیز با روش رقت‌های متوالی میکرودیلوشن 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 برروی آگار ممانعت به‌عمل آورد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد ( Emmanuel *et al.*, 2015).

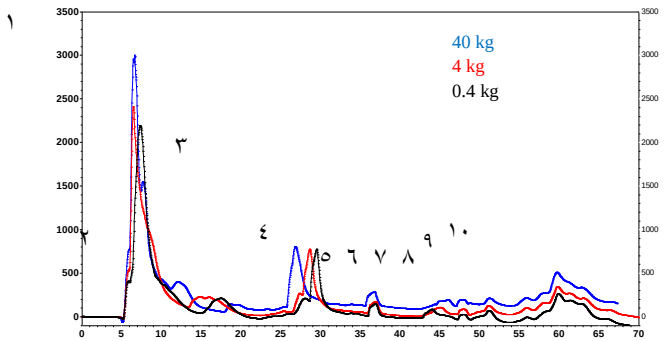
**آنالیزهای آماری:** طبقه‌بندی و آنالیز داده‌ها به‌کمک نرم افزارهای Excel-2016 و SPSS-18 انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۰/۰۵ = α استفاده گردید.

## ۳ | نتایج

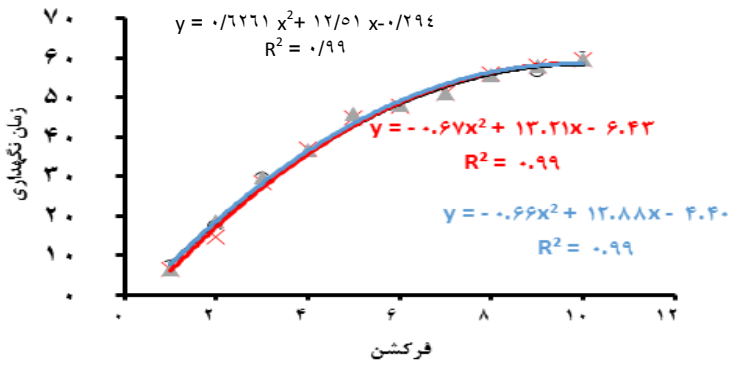
**کروماتوگرافی فاز معکوس:** مقایسه کروماتوگرافی موکوس سه گروه وزنی فیل‌ماهی در شکل ۱ ارائه گردیده است. کروماتوگرام حاصل از حجم و مقدار تزریقی یکسان، مشابه بودند. ، تعداد فرکشن‌ها (۱۰ فرکشن در طول موج ۲۱۴ نانومتر) کاملاً یکسان و نمودار لگاریتمی زمان ماندگاری منطبق برهم و بدون هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بود در حالی‌که سطح زیر منحنی در فرکشن‌های ۲، ۵ و ۹ گروه‌های وزنی دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p \leq ۰/۰۵$).

**زمان ماندگاری:** مقایسه زمان ماندگاری فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی فاز معکوس سه گروه وزنی فیل‌ماهی کاملاً منطبق برهم و بدون هیچ تفاوت معنی‌داری بود ($R^2_1=R^2_2=R^2_3= ۰/۹۹$). 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 ($p \leq ۰/۰۵$). 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 ($p \leq ۰/۰۵$).




**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**

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

**جدول ۳- درصد سطح زیر منحنی فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی سه گروه وزنی موکوس فیل‌ماهی**

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

*تفاوت معنی‌دار بین سه گروه وزنی ($p \leq ۰/۰۵$)

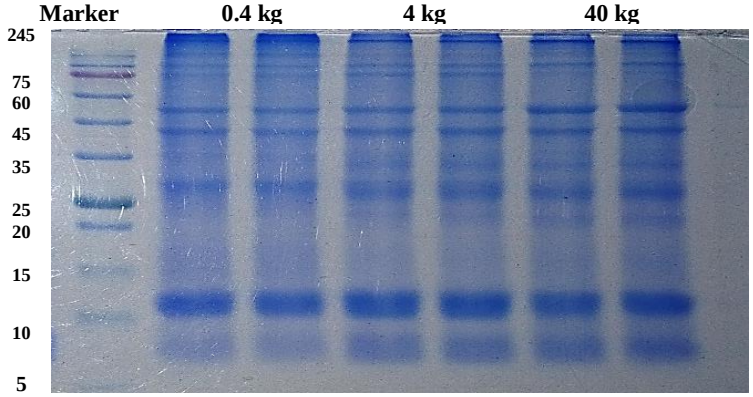
مقایسه غلظت پروتئین: در بررسی مقایسه غلظت پروتئین کل موکوس هیچ تفاوت معنی‌داری بین سه گروه وزنی مشاهده نشد (به‌ترتیب: ۰/۰۳ ± ۱/۰۲، ۰/۰۱ ± ۱/۰۴، ۰/۰۲ ± ۱/۰۷میکروگرم بر میکرولیتر)، درحالی‌که در مقایسه غلظت پروتئین فرکشن‌های حاصله در فرکشن ۴ در وزن‌های مختلف تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. گروه وزنی سوم مقدار بالاتری پروتئین را نشان داد (جدول ۴). خروجی ژل 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 (۷ ≈ کیلودالتون) باندهای موجود با اختلاف اندکی وابستگی به وزن را در شدت بیان نشان دادند(شکل ۳).

**جدول۴- غلظت پروتئین فرکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی موکوس سه گروه وزنی فیل‌ماهی**

| | غلظت پروتئین (میکروگرم بر میکرولیتر) (میانگین ± انحراف معیار) | | |
|---|---|---|---|
| | گروه وزنی اول | گروه وزنی دوم | گروه وزنی سوم |
| فرکشن ۱ | ۱/۳۹ ± ۰/۱۴ | ۱/۴۲ ± ۰/۱۹ | ۱/۴۳ ± ۰/۰۳ |
| فرکشن ۲ | ۰/۱۱ ± ۰/۰۱ | ۰/۱۲ ± ۰/۰۱ | ۰/۱۴ ± ۰/۰۰ |
| فرکشن ۳ | ۰/۰۷ ± ۰/۰۰ | ۰/۰۸ ± ۰/۰۰ | ۰/۰۷ ± ۰/۰۱ |
| فرکشن ۴* | ۱/۰۹ ± ۰/۰۲[a] | ۱/۰۹ ± ۰/۰۱[a] | ۱/۱۷ ± ۰/۰۱[b] |
| فرکشن ۵ | ۰/۸۴ ± ۰/۰۸ | ۰/۸۵ ± ۰/۰۱ | ۰/۸۶ ± ۰/۰۰ |
| فرکشن ۶ | ۰/۳۰ ± ۰/۰۱ | ۰/۳۱ ± ۰/۰۰ | ۰/۳۱ ± ۰/۰۰ |
| فرکشن ۷ | ۰/۱۱ ± ۰/۰۰ | ۰/۱۰ ± ۰/۰۰ | ۰/۰۹ ± ۰/۰۱ |
| فرکشن ۸ | ۰/۳۳ ± ۰/۰۳ | ۰/۳۵ ± ۰/۰۱ | ۰/۳۷ ± ۰/۰۲ |
| فرکشن ۹ | ۰/۰۸ ± ۰/۰۱ | ۰/۱۰ ± ۰/۰۱ | ۰/۰۹ ± ۰/۰۱ |
| فرکشن ۱۰ | ۰/۸۳ ± ۰/۰۳ | ۰/۸۰ ± ۰/۰۱ | ۰/۸۱ ± ۰/۰۲ |

*وجود تفاوت معنی‌دار بین سه گروه وزنی ($p \leq ۰/۰۵$)




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

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

در تست انتشار دیسک، موکوس هر سه گروهی وزنی فعالیت ضد-باکتریایی مشابهی را در برابر *A. hydrophila* نشان دادند درحالی‌که در مواجهه با *S. iniae* گروه وزنی اول (۰/۴ کیلوگرم) به‌طور معنی‌داری هاله عدم رشد کمتری را نشان داد ($p \leq ۰/۰۵$) (جدول ۵).

**کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) و باکتری‌کشی (MBC)**: در بررسی فعالیت ضدباکتریایی موکوس خام سه رده وزنی جهت تعیین 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 ($MIC_{48} = MBC_{48} = ۲۵$ میکروگرم) (جدول ۶).

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

| | هاله عدم رشد (میلی‌متر) (میانگن ± انحراف معیار) | | | |
|---|---|---|---|---|
| **باکتری/ تیمار** | **گروه وزنی اول** | **گروه وزنی دوم** | **گروه وزنی سوم** | **آنتی بیوتیک (CRO)** |
| **آئروموناس هیدروفیلا** | ۱۱/۱۶ ± ۰/۲۸$^{a}$ | ۱۲/۰۰ ± ۰/۰۰$^{a}$ | ۱۱/۷۶ ± ۱/۴۲$^{a}$ | ۱۷/۸۰ ± ۰/۶۵$^{b}$ |
| **استرپتوکوکوس اینیایی** | ۱۲/۰۳ ± ۰/۹۵$^{a}$ | ۱۵/۴۰ ± ۰/۵۲$^{b}$ | ۱۵/۶۳ ± ۰/۷۷$^{b}$ | ۲۹/۳۰ ± ۰/۶۲$^{c}$ |

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

| تیمار | آزمون | باکتری | |
|---|---|---|---|
| | | 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 این‌حال، 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 توجیه 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 (۰/۰۳ ±۰/۷۳. میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به موکوس ماهیان جوانتر (۰/۰۱ ±۰/۶۳. 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 حالی‌که، غلظت نمونه‌های خام در مطالعه حاضر ($W_3 = ۱/۰۷ \pm ۰/۰۲$ ، $W_2 = ۱/۰۴ \pm ۰/۰۱$ ، $W_1 = ۱/۰۲ \pm ۰/۰۳$ میکروگرم بر میکرولیتر) تفاوت معنی‌داری نداشت. امروزه، ماهی از منابع بالقوه زیست فعال درنظر 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 این‌حال 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 پاتوژن ها 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

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

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 این‌حال 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 تقریبی۷ کیلو دالتون در گروه اول در مقایسه با گروه های 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 گروه های 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 معنی-داری بود در حالی‌که سطح زیر منحنی در فرکشن‌های ۲، ۵ و ۹ دارای تفاوت معنی‌دار بود ($p \leq ۰/۰۵$). 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 می-شود.

علاوه‌بر سد مکانیکی، عوامل دفاعی مختلفی از جمله ایمونو-گلوبولین، پروتئین واکنشی C، لکتین، لیزوزیم، همولیزین و پپتیدهای ضدمیکروبی 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). گونه-های بیماری‌زا دارای یک لایه S در دیواره سلولی و توانایی تولید بیشتر الاستاز هستند، لیکن ارتباط بسیاری میان بیماری‌زایی و اگزوتوکسین-های 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 گرم‌منفی بسیار ضعیف‌است (Gobinath and Ravichandran, 2011). در اثبات این فرضیه، در مطالعه حاضر نیز، موکوس در مواجهه با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (*S. iniae*) به‌عنوان نماینده باکتری-های گرم مثبت و عامل بیماری برگشت‌پذیر تعداد بسیاری از ماهیان وحشی و پرورشی آب شور و شیرین در جهان و مشترک با انسان که در ماهیان خاویاری منطقه آددریاتیک نیز گزارش شده است، نسبت به آئروموناس هیدروفیلا (*A. hydrophila*)، به‌عنوان نماینده باکتری‌های گرم منفی و رایج‌ترین عامل بیماری‌زای آبزی‌پروری، به‌طور میانگین عدم هاله رشد بالاتری را نشان دادند. مقایسه بین گروه‌های وزنی فعالیت ضد باکتریایی مشابهی را در برابر *A.hydrophila* نشان داد در حالی‌که در مقایسه بین گروه‌های وزنی، وزن اول، به‌طور 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 دگردیسی 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 ضدمیکروبی 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 گروه-های 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; Kuppulakshmi *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 گروه های وزنی فعالیت ضدمیکروبی 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 ($MIC_{48} = MBC_{48} = 25$ میکروگرم) سه گروه و حتی نسبت به باکتری دیگر هم وجود نداشت. از این‌رو 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 ضدمیکروبی موکوس بوده است. باتوجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه غلظت پروتئین، الگوی پروتئین در SDS-PAGE، کروماتوگرام و فعالیت ضدمیکروبی، می‌توان بیان نمود که از نظر ایمنی اولیه، گروه وزنی اول (یعنی ۰/۴ کیلوگرم) به سطح تکاملی

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]
[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

هم‌سطح وزن‌های بالاتر (یعنی ۴ و ۴۰ کیلوگرم) رسیده است. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی برای مشاهده تفاوت‌های احتمالی این‌تفاوت ساختاری و عملکردی موکوس در صورت دسترسی، دامنه‌وزنی وسیع‌تری مورد بررسی قرار گیرد.

**پست الکترونیک نویسندگان**

فاطمه خانی: F.khani88@gmail.com

عبدالمجید حاجی‌مرادلو: ahajimoradloo@yahoo.com

رسول قربانی: rasulghorbani@gmail.com

دلاور شهباززاده: shahbazzade@yahoo.com

کامران پوشنگ باقری: kamranpb@gmail.com

**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 accurrence 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.) 2end 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 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 Publishe.

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.

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

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 *(Oncorhynchys 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 WJ., 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 KR., 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

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]

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.، حاجی‌مرادلو ع.، قربانی ر.، شهباززاده د.، پوشنگ باقری ک. ۱۴۰۱. مقایسه پروفایل و فعالیت ضدمیکروبی موکوس اپیدرم فیل‌ماهی (*Huso huso* Linnaeus 1758) در رده‌های وزنی مختلف. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۱۰(۱): ۵۶-۴۶. https://doi.org/10.22034/jair.10.1.51

Khani F., Hajimoradloo A., Ghorbani R., Shahbazzadeh 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

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOI: 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 F[1]., Hajimoradloo A[1*]., Ghorbani R[1]., Shahbazzadeh D[2]., Pooshang Bagheri K[2].**

[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 µg/µl, respectively) but HPLC fraction No.4 in the third weight (40kg) showed a significant higher concentration in comparison to others (α=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 (α=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 ($MIC_{48}$=$MBC_{48}$=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.iniaei*. 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

[ Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-16 ]

[ DOI: 10.22034/jair.10.1.51 ]