

مقاله پژوهشی

غربالگری موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر
(*Neogobius fluviatilis pallasii*) برای یافتن پپتیدهای ضدباکتریایی

محمد اخوان بهابادی^{۱،۲*}، حامد پاک‌نژاد^۳، مهران حبیبی رضائی^۴، سید علی اکبر هدایتی^۵، حمید مقیمی^۶

تاریخ دریافت: اسفند ۹۸

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۹

چکیده

در سال‌های اخیر ظهور و گسترش باکتری‌های مقاوم به چند دارو، موضوع اصلی نگرانی در زمینه‌های پزشکی و سلامت عمومی بوده است. پپتیدهای ضد میکروبی، پپتیدهای کوتاه زنجیره و عموماً دارای بار مثبت و آبگریز هستند که در طیف گسترده‌ای از اشکال زندگی از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌ها مانند انسان یافت می‌شوند. معرفی این دسته از پپتیدها، به جهت داشتن برخی مزایا در رفع بعضی از نگرانی‌های جامعه بشری، بسیار نویدبخش بوده است. در این مطالعه برای اولین بار فعالیت ضد میکروبی موکوس اپیدرمی *Neogobius fluviatilis pallasii* و کسرهای مبتنی بر اندازه (Size-based Fractions) آن، گزارش شده است. بر اساس نتایج این بررسی، کسر زیر ۵ کیلو دالتون علیه *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* به ترتیب با شعاع بازدارندگی ۱۲/۲۵ و ۱۹/۲۵ میلی‌متر کشنده و بر *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Yersinia ruckeri* بی‌اثر گزارش شد. تیمار پروتئولیتیک کسر مزبور با پروتئیناز K فعالیت ضدباکتریایی را به طور کامل از بین برد که تایید کننده ماهیت پروتئینی جزء فعال است. به طور کلی، این نتایج نشان داد که موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر یک منبع غنی و با ارزش برای یافتن AMPهای جدید با کاربردهای بالقوه در آبی‌پروری و پزشکی است.

واژگان کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پپتیدهای ضد میکروبی، ایمنی موکوسی، گاوماهی.

- ۱- دکتری شیلات، گروه تکثیر پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
 - ۲- دکتری شیلات، مرکز تحقیقات ملی آبزیان آب‌های شور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بافق، ایران.
 - ۳- دانشیار گروه تکثیر پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
 - ۴- استاد گروه علوم سلولی و ملکولی، آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی پروتئین، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
 - ۵- دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
 - ۶- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- * نویسنده مسئول: akhavanm@ut.ac.ir

مقدمه

منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در صنعت آبی‌پروری و در نتیجه بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عوامل بیماری‌زای ماهی شده است (Cabello et al., 2013). ارتباط احتمالی ژن‌های مقاومت به عوامل بیماری‌زای جانوران آبی و انسانی، منجر به پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های جدید، انتشار گسترده آن‌ها و انتقال ژن‌های مقاومت به جانوران خشکی و جوامع انسانی می‌شود (Cabello et al., 2016).

در سال ۲۰۱۷، سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) یک فوریت عمومی برای یافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید را اعلان کرد (WHO, 2017). علاوه بر این WHO اضطراب جهانی را مبنی بر نیاز ضروری برای تامین اعتبارات بیشتر به منظور پژوهش روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و به طور خاص «عوامل بیماری‌زای اولویت‌دار»، اعلام کرد و هشدار داد که در صورت عدم تحقق آن، جهان به «دوران ما قبل از آنتی‌بیوتیک‌ها» باز خواهد گشت (WHO, 2017). علاوه بر این، پیش‌بینی می‌شود که مرگ و میر جهانی در اثر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون برسد که این میزان بیشتر از تلفات ناشی

آبی‌پروری سریع‌ترین رشد را در بخش کشاورزی دارد و پیش‌بینی می‌شود رشد سریع خود را در مواجهه با افزایش جمعیت و کاهش صید از منابع طبیعی در دهه‌های آتی ادامه دهد. بنابراین نرخ جهانی رشد آبی‌پروری و در عین حال استفاده گسترده و بعضاً نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها برای پیشگیری و درمان، از جمله موارد تهدید کننده سلامت مصرف‌کنندگان و نگرانی در پزشکی محسوب می‌شود. این وضعیت به ویژه در کشورهای در حال توسعه، برای جلوگیری از بیماری‌های باکتریایی ناشی از ضعف شرایط بهداشتی، در سیستم‌های پرورش فوق متراکم اتفاق می‌افتد. در بسیاری از کشورها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دامپروری از به کارگیری آن‌ها در مصارف پزشکی پیشی گرفته است (Van Boeckel et al., 2015; Robinson et al., 2016) و ممکن است در برخی از کشورها این وضعیت برای آبی‌پروری نیز اتفاق بیافتد. به عنوان مثال، در بخش آبی‌پروری شیلی، میزان مصرف فلوروکینولون‌ها (Fluoroquinolone) در برخی سال‌ها بیش از ده برابر استفاده آن‌ها در مصارف درمانی انسانی بوده است (Rico et al., 2013; Cabello et al., 2016). این فرآیند

آنتی‌بیوتیکی، آن‌ها را به عنوان یک نامزد استثنایی برای پیشرفت‌های بالینی در قالب آنتی‌بیوتیک‌های منحصر به فرد معرفی کرده است (Rajanbabu and Chen, 2011).

سیستم ایمنی ماهی‌ها، همانند مهره‌داران پیشرفته‌تر دارای دو دسته پاسخ ایمنی شامل پاسخ ایمنی غیراختصاصی (Nonspecific)، طبیعی (Natural) یا ذاتی (Innate Response) و پاسخ ایمنی اختصاصی (Specific)، تطبیقی (Adaptive) یا اکتسابی (Acquired) است (Magnadottir, 2006; Zapata et al., 2006; Nakanishi et al., 2011). ایمنی غیراختصاصی مجموعه‌ای از ساز و کارهای دفاعی را تشکیل می‌دهد که جاندار را در برابر عفونتی که هیچگونه مواجهه قبلی با عامل بیماری‌زا نداشته، محافظت می‌کند (اولین خط دفاعی در برابر عفونت) و برای جانوران خونسرد (Poikilothermic) مانند ماهی بسیار مهم است که شامل موانع فیزیکی و پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال است (Valero et al., 2013). ایمنی غیراختصاصی در ماهیان به دلیل محدودیت سیستم ایمنی اکتسابی، خونسرد بودن، تامین محدود آنتی‌بادی‌ها، تکثیر و بلوغ آهسته و حافظه لنفوسیت‌های آن‌ها، به عنوان یک عنصر ضروری در مقابله با

از سرطان و بیماری‌هایی مانند دیابت است (O'neill, 2014). در نتیجه، کشف و توسعه عوامل ضد میکروبی جایگزین، ضروری است. پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial Peptides: AMPs)، پپتیدهای کوتاه زنجیره، عموماً دارای بار مثبت و آبگریز هستند، که در گستره وسیعی از اشکال زیستی از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌ها از جمله انسان یافت می‌شوند (Masso-Silva and Diamond, 2014). معرفی این دسته از پپتیدها، به جهت داشتن برخی مزایا در مورد نگرانی‌های جامعه بشری بسیار نویدبخش بوده است. آن‌ها در سلول‌های میلوئیدی شامل نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و همچنین در بافت‌های مخاطی (شامل پوست، آبشش، روده و مجرای بینی) مهره‌داران و بی‌مهرگان، به عنوان یک گروه جدید از آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شده‌اند که منجر به تحریک علاقه پژوهشی در این زمینه به عنوان عوامل درمانی منحصر به فرد برای بیماری‌های عفونی ناشی از میکروب‌های مقاوم به چندین دارو (Multidrug-Resistant Microbes) شده‌اند (Rakers et al., 2013). با وجود این که هیچ داروی مبتنی بر AMP در بازار وجود ندارد، عمل انتخابی، ویژگی ضد میکروبی طبیعی و ظرفیت ناچیز AMPها در ایجاد مقاومت

میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا محسوب می‌شود (Magnadottir, 2006; Whyte, 2007). در نتیجه، ماهی‌ها، به ویژه در دوره آنتوژنی (Ontogeny)، وابستگی بیشتری به اجزای ایمنی ذاتی دارند.

از آنجایی که نقش محافظتی موکوس اپیدرمی ماهی سال‌ها است که شناخته شده است (Ellis, 2001; Hellio et al., 2002) و اجزای ضد میکروبی موکوس اپیدرمی، برای محافظت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم، به صورت پیوسته یا القایی تولید می‌شوند، در نتیجه موکوس اپیدرمی ماهی منبع غنی برای جداسازی پپتیدهای ضد میکروبی محسوب می‌شود (Park et al., 1998). بنابراین در این بررسی، اثر ضد میکروبی کسرهای تهیه شده از موکوس گاوماهی شنی دریای خزر علیه عوامل میکروبی گزارش شده است.

از طرف دیگر، ماهی‌ها با تقریباً ۴۰,۰۰۰ گونه، متنوع‌ترین گروه را بین مهره‌داران تشکیل می‌دهند و هر کدام AMP‌هایی را با تفاوت‌های ساختاری ترشح می‌کنند. علاوه بر این، ترکیب موکوس در بین گونه‌های ماهی بسیار متغیر است و ترکیب آن تحت تاثیر عوامل درونی (به عنوان مثال، مرحله رشد، جنسیت) و عوامل خارجی (مانند جیره غذایی، عوامل فیزیکوشیمیایی، محرک‌های سیستم ایمنی، عفونت‌ها و استرس) قرار دارد (Esteban, 2012). در نتیجه موکوس اپیدرمی ماهی‌ها یک منبع غنی و با ارزش برای یافتن AMP‌های جدید با کاربردهای بالقوه در آبی‌پروری و پزشکی انسانی است. در حالی که تعداد بی‌شماری از AMP‌ها در موکوس اپیدرمی بسیاری از دوزیستان و پستانداران از جمله انسان گزارش شده است (Pukala et al.,

از آنجایی که نقش محافظتی موکوس اپیدرمی ماهی سال‌ها است که شناخته شده است (Ellis, 2001; Hellio et al., 2002) و اجزای ضد میکروبی موکوس اپیدرمی، برای محافظت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم، به صورت پیوسته یا القایی تولید می‌شوند، در نتیجه موکوس اپیدرمی ماهی منبع غنی برای جداسازی پپتیدهای ضد میکروبی محسوب می‌شود (Park et al., 1998). بنابراین در این بررسی، اثر ضد میکروبی کسرهای تهیه شده از موکوس گاوماهی شنی دریای خزر علیه عوامل میکروبی گزارش شده است.

گاوماهیان با ۳۲ گونه از ۱۰ جنس، متنوع‌ترین خانواده ماهیان دریای خزر محسوب می‌شوند. جنس‌های *Benthophilus* و *Neogobius* به ترتیب با ۱۴ و ۱۱ گونه از مهم‌ترین جنس‌های خانواده گاوماهیان دریای خزر به شمار می‌آیند.

جدول ۱: پپتیدهای ضد میکروبی (AMP) شناسایی شده در ماهی‌ها با منشأ موکوس اپیدرمی

منبع	منشأ		AMP
	نام علمی	نام	
Oren and Shai, 1996	<i>Pardachirus marmoratus</i>	Moses sole	Pardaxin
Cole et al., 1997	<i>Pleuronectes americanus</i>	Winter flounder	Pleurocidin
Park et al., 1998	<i>Parasilurus asotus</i>	Catfish	Parasin 1
Fernandes et al., 2002	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	S30
Birkemo et al., 2003	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Atlantic halibut	Hipposin
Fernandes et al., 2003	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	Oncorhyncin III
Fernandes et al., 2004	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	Oncorhyncin II
Luders et al., 2005	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon	SAMP-H1
Bergsson et al., 2005	<i>Gadus morhua</i>	Atlantic cod	Histone H2B
Bergsson et al., 2005	<i>Gadus morhua</i>	Atlantic cod	L35, L36A, L40
Subramanian et al., 2009	<i>Myxine glutinosa</i>	Hagfish	Myxinidin
Su et al., 2011	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	Yellow catfish	Pelteobagrin
Liang et al., 2011	<i>Anguilla japonica</i>	Japanese eel	AJN-10

کمتر مورد توجه با پراکنش مکانی متوسط و فراوانی جمعیتی بالا قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و جمع‌آوری موکوس اپیدرمی

تعداد ۶۰ قطعه گاوماهی شنی دریای خزر (*Neogobius fluviatilis pallasii*) سالم (دامنه وزنی ۵۰-۶۰ گرم) از محل قفس‌های ماهیان خاویاری شرکت مادر تخصصی ماهیان

زیرگونه *Neogobius fluviatilis pallasii*

با نام فارسی گاوماهی شنی دریای خزر و نام انگلیسی Caspian Sand Goby. بومی دریای خزر است و پراکنش وسیعی در حوضه جنوبی خزر و رودخانه‌های منتهی به آن مثل گرگانرود، تجن، بابلرود، هراز، سردآبرود، ارس، تنکابن، پلرود، سفیدرود، تالاب انزلی و خلیج گرگان دارد که بر اساس طبقه‌بندی IUCN در طبقه

استخراج حاوی سدیم استات ۰/۲ مولار، تریتون X-۱۰۰ ۰/۲ درصد و PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) یک میلی مولار (pH ۸/۴) با استفاده از یک همزن بلندر (Eberhard, D-7300 Esslingen, Bauer, آلمان) همگن شد و مخلوط به دست آمده به مدت یک شبانه روز روی همزن مغناطیسی (MR 3001k, Heidolph, آلمان) در دمای ۴ درجه سانتی گراد هم زده شد تا کاملاً یکنواخت شود. به منظور حذف ذرات غیرمحلول و جامد، مخلوط به دست آمده با دور ۲۰,۰۰۰g و به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (Sigma, 2-16 KL, آلمان) و مایع رویی جمع آوری شد. پس از آن مایع رویی در معرض کارتریج های Sep-Pak C18 (Macherey-Nagel, آلمان) فاز معکوس (Reverse Phase) قرار گرفت که با ۸۰ درصد استونیتریل حاوی ۰/۱ درصد (حجمی / حجمی) تری فلوروآستیک اسید (TFA) (بافر A) فعال و با ۰/۱ درصد TFA (حجمی / حجمی) (بافر B) برای حذف استونیتریل اضافی شسته شده بود، استفاده شد. پس از بارگیری مایع رویی، کارتریج با ۲۰ میلی لیتر بافر B شسته شد و پپتیدهای به دام افتاده در آن با ۶ میلی لیتر بافر A از ستون شسته شد. سپس شسته ها (Eluates) یکی

خواری استان گلستان (آشوراده، بندر ترکمن) به وسیله تور صید شد. جمع آوری موکوس اپیدرمی به روش Subramanian و همکاران (۲۰۰۷) با کمی تغییرات صورت پذیرفت. به طور خلاصه، تعداد ۵ ماهی به داخل یک کیسه زیپ دار پلی اتیلنی حاوی ۵ میلی لیتر محلول نمکی ۱۰۰ میلی مولار منتقل و ماهی ها به آرامی به مدت ۲-۱ دقیقه به منظور جدا شدن موکوس اپیدرمی به جلو و عقب حرکت داده شدند. نمونه های موکوس با هم یکی شدند و به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی و غیرفعال ساختن پروتئازها، بلافاصله توسط ازت مایع منجمد و با تانک ازت به آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی پروتئین دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران منتقل شد. نمونه ها تا انجام مراحل بعدی داخل فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج فاز جامد

آماده سازی نمونه ها برای تغلیظ محتوای پروتئینی و تخلیص اولیه روی ستون های SPE (Solid-Phase Extraction) به روش Park و همکاران (۱۹۹۸) با اندکی تغییرات انجام شد. موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریایی خزر به میزان ۱۰۰ میلی لیتر در ۴۰۰ میلی لیتر بافر

استاندارد بردفورد (Bradford, 1976) با استفاده از آلومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) به عنوان استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد.

بررسی پروفایل پروتئینی نمونه‌ها

در هر مرحله، خلوص و وزن مولکولی پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE Tricine با ژل جدا کننده ۱۶ درصد و ژل متراکم کننده ۱۰ و ۴ درصد تعیین شد (Schagger and Von Jagow, 1987). وزن مولکولی نسبی باندها توسط لدر پروتئینی (۲۵۰-۱۰ کیلودالتون، سیناژن، ایران) تخمین زده شد.

سنجش فعالیت ضد میکروبی به روش نشر شعاعی

میکرواورگانیزم‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر در جدول ۲ معرفی شده است. در این مطالعه فعالیت ضد میکروبی علیه ۶ میکروارگانیزم بیماری‌زا شامل عوامل بیماری‌زا در ماهیان *Vibrio harveyi* و *Yersinia ruckeri* و چهار سویه مرجع (*Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Bacillus* و *Staphylococcus aureus*)

شده و به روش انجمادی خشک شدند (Freeze Drying). پودرهای به دست آمده در کمترین حجم از آب مقطر حل شد و در ادامه آزمون‌های مورد نظر انجام شد.

الترافیلتراسیون (کسرگیری)

همان طور که قبلاً ذکر شد AMPها دارای وزن ملکولی پایین می باشند. بنابراین در این مرحله، برای حذف پپتیدهایی با وزن ملکولی بالا، از فیلترهای سانتریفیوژی (MWCO Sartorius, Ultra-15, 5kDa، آلمان) با ۴ حد عبور (Cut off) مختلف (شامل ۳۰، ۱۰، ۵ و ۳ کیلودالتون) استفاده شد. پودر به دست آمده از خشک کن انجمادی تا حدی با آب مقطر رقیق شد تا محلولی پروتئینی با غلظت حدودی نیم میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. زیرا غلظت بالای محلول باعث گرفتگی غشای فیلترها و از دست دادن مقادیر زیادی پروتئین می شود. در انتها، کسرهای (Fractions) به دست آمده (بالا و زیر ۵ کیلودالتون) به روش انجمادی خشک شد و آزمون‌های مورد نظر روی آن‌ها انجام شد.

سنجش غلظت پروتئین تام

میزان پروتئین تام نمونه‌های موکوس اپیدرمی و کسرهای آن بر اساس دستور العمل

جدول ۲: باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه

گونه باکتری	کد	گرم مثبت/منفی
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 62037	مثبت
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC**15752	مثبت
<i>Yersinia ruckeri</i>	PTCC*1888	منفی
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	منفی
<i>Vibrio harveyi</i>	PTCC 1755	منفی
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 27325	منفی

* Persian Type Culture Collection

** American Type Culture Collection

پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از طی این مدت، شعاع هاله عدم رشد بیانگر میزان حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها به کسرهای مختلف است.

هضم پروتئینی (Proteolytic Digestion)

به منظور تعیین ماهیت پروتئینی کسرهای زیر و بالای ۵ کیلودالتون، فعالیت ضدباکتریایی این کسرها به دنبال هضم با غلظت نهایی ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئیناز K (Sigma)، آلمان) به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به روش نشر شعاعی همانند بالا ارزیابی شد (Fernandes et al., 2002).

subtilis) به روش نشر شعاعی (Radial Diffusion Assay: RAD) مورد آزمایش قرار گرفت. در این روش، از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت برات (Ibresco، ایران)، به وسیله سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ درصد، سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم‌مک‌فارلند (۰/۰۷ تا ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه شد. سپس با کمک سواب استریل، کشت یکنواختی از باکتری بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller-Hinton Agar) صورت گرفت. سپس صفحه‌های شاهد (دیسک‌های بلانک) استریل آغشته شده با نمونه‌های مورد نظر روی محیط کشت حاوی باکتری قرار داده شد. در ادامه،

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و t-Test و برای مقایسه فعالیت ضدباکتریایی از پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد و نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 رسم شد.

نتایج

تصفیه جزئی موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر و فعالیت ضدباکتریایی آن

موکوس اپیدرمی خام جدا شده از گاوماهی شنی دریای خزر دارای ۴۰۰ میکروگرم پروتئین بود (جدول ۳)، با این وجود، فعالیت ضد میکروبی آن به روش نشر شعاعی تشخیص داده نشد. فعالیت ضدباکتریایی برای اولین بار پس از همگن‌سازی موکوس در بافر استخراج، سانتریفیوژ و تغلیظ پپتیدهای موجود در مایع رویی توسط SPE در یک کارتریج Sep-Pak C18 مشاهده شد (شکل ۱). در ادامه، نتایج الترافیلتراسیون که به منظور یافتن کسر (یا کسرهای) اصلی دارای فعالیت ضد میکروبی انجام شده بود، نشان داد که فقط شسته‌های به دست آمده از SPE و کسرهای بالای

۳۰ و زیر ۳ کیلودالتون به دست آمده از آن، فعالیت ضد میکروبی را تنها در برابر *S. aureus* و *B. subtilis* به نمایش گذاشتند (شکل ۱). با توجه به این که بین کسرهای دارای فعالیت، کسر زیر ۳ کیلودالتون کمترین غلظت پروتئین را داشت، این کسر دارای بهترین میزان فعالیت ضدباکتریایی بود (جدول ۳). غلظت‌های پروتئینی کسرهای مختلف نشان داد که میزان قابل توجهی از پروتئین در فرآیند کسرگیری توسط فیلترهای سانتریفیوژی از دست رفته است (جدول ۳). بنابراین تصمیم گرفته شد تنها از یک حد عبور استفاده شود و برای اطمینان از جمع‌آوری حداکثر پپتیدهای دارای فعالیت ضدباکتریایی، حد عبور ۵ کیلودالتون انتخاب شد. نتایج نشان داد که تنها *S. aureus* و *B. subtilis* نسبت به کسرهای بالا و زیر ۵ کیلودالتون حساس بودند (شکل ۲).

نتایج نشان داد بهترین فعالیت ضدباکتریایی مربوط به کسر زیر ۵ کیلودالتون بود به این دلیل که غلظت پروتئینی بسیار کمتری نسبت به کسر بالای ۵ کیلودالتون داشت (جدول ۴).

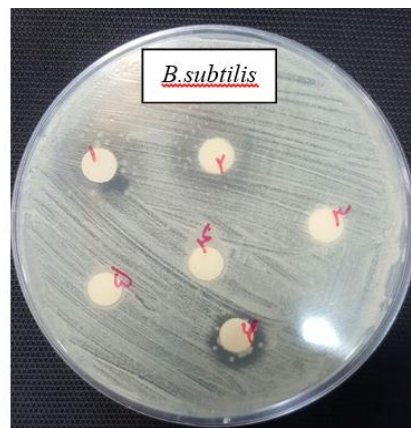
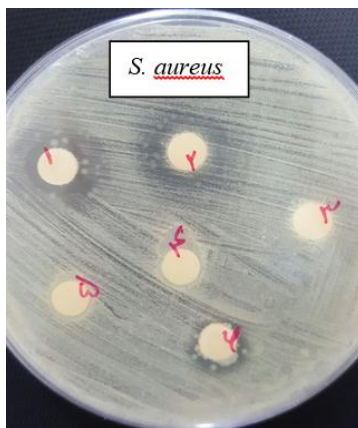
نتایج مربوط به هضم پروتئینی کسرهای پروتئیناز K نشان دهنده از بین رفتن کامل فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها بود که بیانگر ماهیت پروتئینی عامل فعال است (شکل ۳).

جدول ۳: میزان غلظت پروتئین نمونه‌های موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر و اثر آن بر مهار رشد باکتری (میانگین \pm انحراف معیار)

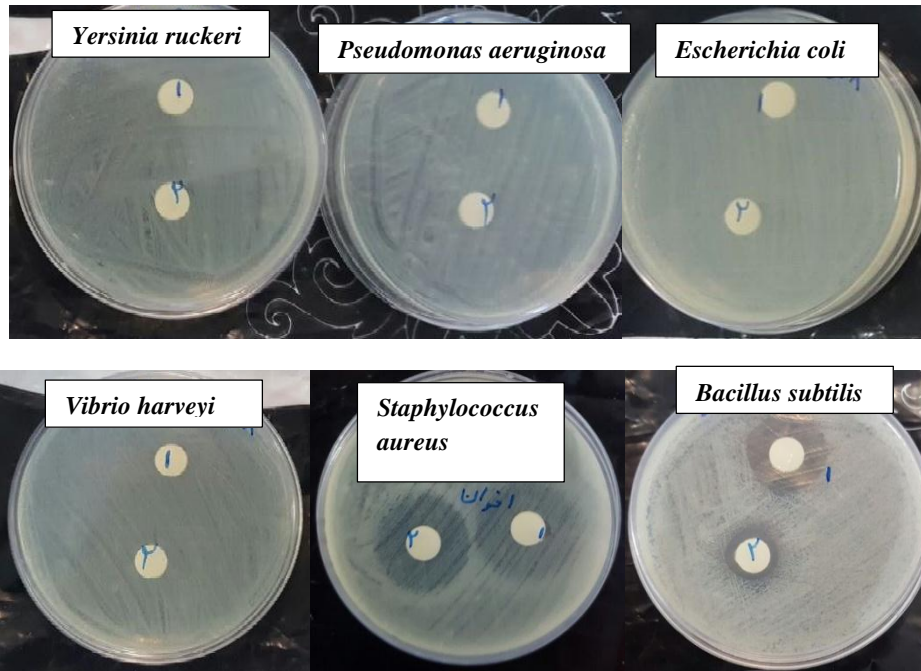
قطر هاله بازدارنده (mm)		غلظت پروتئین ($\mu\text{g/mL}$)	نمونه‌ها
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		
-	-	۴۰۰	موکوس اپیدرمی خام
$15/2 \pm 75/1^a$	$15/2 \pm 25/0^a$	۴۷۲۲	موکوس تغلیظ شده توسط SPE
$17/1 \pm 5/3^a$	$16/1 \pm 75/0^a$	۱۴۸۵	کسر بالای ۳۰ کیلودالتون
-	-	۴۰۰	کسر ۱۰-۳۰ کیلودالتون
-	-	۹	کسر ۵-۱۰ کیلودالتون
-	-	*	کسر ۳-۵ کیلودالتون
$1 \pm 12/0^b$	$12/0 \pm 25/5^b$	*	کسر زیر ۳ کیلودالتون

*: خارج از محدوده حساسیت روش بردفورد

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0/05$).



شکل ۱: فعالیت ضد میکروبی شسته‌های به دست آمده از SPE موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر و کسرهای به دست آمده از آن در برابر *Bacillus subtilis* و *Bacillus aureus*. شماره ۱: شسته‌های به دست آمده از SPE؛ شماره ۲: کسر بالای ۳۰ کیلودالتون؛ شماره ۳: کسر بین ۱۰-۳۰ کیلودالتون؛ شماره ۴: کسر بین ۵-۱۰ کیلودالتون؛ شماره ۵: کسر بین ۳-۵ کیلودالتون؛ شماره ۶: کسر زیر ۳ کیلودالتون.



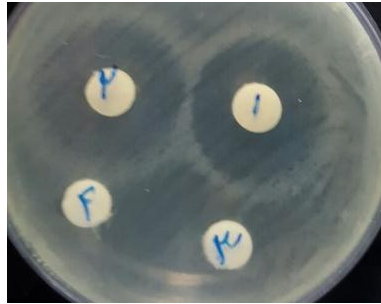
شکل ۲: فعالیت ضد میکروبی کسرهای بالا (شماره ۱) و زیر (شماره ۲) ۵ کیلودالتون به دست آمده از SPE موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر علیه سویه‌های باکتریایی *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia ruckeri* و *Vibrio harveyi*.

جدول ۴: میزان غلظت پروتئین نمونه‌های موکوس اپیدرمی گاو ماهی شنی دریای خزر و اثر آن بر مهار رشد باکتری (میانگین \pm انحراف معیار)

قطر هاله بازدارنده (mm)		غلظت پروتئین ($\mu\text{g/mL}$)	نمونه‌ها
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		
$22/1 \pm 75/4^a$	$16/2 \pm 45/3^a$	۳۲۶۵	کسر بالای ۵ کیلودالتون
$19/0 \pm 25/5^a$	$12/1 \pm 25/5^b$	*	کسر زیر ۵ کیلودالتون

*: خارج از محدوده حساسیت روش بردفورد

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0/05$).



شکل ۳: بررسی ماهیت پروتئینی عامل فعال موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر به واسطه هضم پروتئینی با پروتئیناز K. شماره ۱: کسر بالای ۵ کیلودالتون؛ شماره ۲: کسر زیر ۵ کیلودالتون؛ شماره ۳: کسر بالای ۵ کیلودالتون پیش تیمار شده با پروتئیناز K؛ شماره ۴: کسر زیر ۵ کیلودالتون پیش تیمار شده با پروتئیناز K.

بحث

(Rakers et al., 2013). مکانیسم مستقل از

گیرنده‌ها، توسعه مقاومت به عوامل بیماری‌زا در برابر پیتید را کاهش می‌دهد (Sang and Blecha, 2008; Nakatsuji and Gallo, 2011).

با وجود این که موکوس اپیدرمی خام گاوماهی شنی دریای خزر دارای ۴۰۰ میکروگرم پروتئین بود (جدول ۱)، اما فعالیت ضد میکروبی آن به روش نشر شعاعی، تشخیص داده نشد. نتایج مشابه در مورد Atlantic Halibut (Birkemo et al., 2003)، دو گونه سفره ماهی (*Himantura sphen* و *Dasyatis gerrardi*) (Vennila et al., 2011) و سوف بالارونده (*Anabas testudineus*) (Al-Rasheed et al., 2018) نیز گزارش شده است. در این گونه‌ها، فعالیت ضدباکتریایی

پپتیدهای ضد میکروبی نقش کلیدی در سیستم ایمنی ذاتی علیه عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند (Ellis, 2001). موکوس پوست ماهی‌ها از آنجایی که اولین سد دفاعی آن‌ها در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا است، یک منبع غنی و بالقوه برای جداسازی این پپتیدها است (Esteban, 2012). زمانی که این جانوران زخمی می‌شوند و یا در معرض میکروارگانیزم و یا عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرند، تولید و رهاسازی AMPها توسط سلول‌های مخصوصی در پوست فعال می‌شود که عوامل بیماری‌زا را با کشتن مستقیم، اختلال در غشا، شناسایی برای عمل فاگوسیتوز (Opsonization) و یا مهار سنتز پروتئین، DNA و یا RNA از بین می‌برند

روش مناسبی است که منجر به بیشترین محصول پروتئین شود. در مطالعات زیادی به منظور حذف همزمان ناخالصی‌ها، تغلیظ پروتئین‌ها و همچنین به علت ماهیت آبریزی AMP، روش استخراج فاز جامد (فاز معکوس) را با موفقیت مورد استفاده قرار دادند (Cole et al., 1997; Park et al., 1998; Fernandes et al., 2002, 2003, 2004; Birkemo et al., 2003; Bergsson et al., 2005; Luders et al., 2005; Subramanian et al., 2009). استفاده از این رویکرد منجر به تغلیظ بیش از ۱۰ برابری محتوای پروتئینی موکوس اپیدرمی و مشاهده فعالیت ضدباکتریایی در این مرحله شد. در مرحله بعد، به منظور یافتن کسر (یا کسرهای) اصلی دارای فعالیت ضد میکروبی از فیلترهای سانتریفیوژی با ۴ حد عبور مختلف (شامل ۳۰، ۱۰، ۵ و ۳ کیلودالتون) استفاده شد که با توجه به از دست دادن میزان قابل توجهی از پروتئین در فرآیند کسرگیری که ممکن است به صورت جذب یا رسوب روی سطح خارجی غشا (گرفتگی خارجی) یا درون حفره‌های غشای (گرفتگی داخلی) فیلترها باشد، تصمیم به استفاده از یک حد عبور گرفته شد. بنابراین فعالیت ضدباکتریایی در برابر گونه‌های باکتریایی منتخب برای کسرهای بالا و زیر ۵ کیلودالتون،

موکوس اپیدرمی خام، به روش نشر شعاعی، احتمالاً به دلیل ویسکوزیته بالای موکوس و یا غلظت پایین اجزای دارای فعالیت ضد میکروبی، مشاهده نشد (Birkemo et al., 2003). بنابراین در این مرحله تصمیم به تغلیظ موکوس اپیدرمی گرفته شد. از طرف دیگر نمونه‌های پروتئینی معمولاً حاوی موادی هستند که با روش‌های مورد استفاده پایین دستی تداخل دارند. چندین استراتژی به منظور حذف مواد نامطلوب از نمونه‌ها وجود دارد. یکی از مناسب‌ترین راهکارها، رسوب‌دهی پروتئین‌ها است (Garcia-Rodriguez et al., 2003; Antonioli et al., 2009). این روش در مقایسه با روش‌های دیالیز یا فیلتراسیون ژل (ستون‌های نمک‌زدایی) دارای یک مزیت است، زیرا به طور همزمان تغلیظ نمونه پروتئینی و همچنین تصفیه از مواد نامطلوب را ممکن می‌سازد (Garcia-Rodriguez et al., 2003; Antonioli et al., 2009; Zellner et al., 2005). اما یکی از معایب این رویکرد آن است که پروتئین‌ها ممکن است دناتوره شوند، در نتیجه پلیت‌هایی که حل مجدد آن مشکل است، تشکیل شوند. از طرف دیگر، یک نگرانی در مورد از دست دادن پروتئین‌ها در طول مرحله رسوب‌دهی وجود دارد. بنابراین، نیاز به انتخاب

هر دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت از فسفولیپیدهای اصلی با گروه‌های دارای بار منفی مانند فسفولیپیدهای فسفاتیدیل سرین (Phosphatidylserine)، فسفاتیدیل گلیسرول (Phosphatidylglycerol) و کاردیولیپین (Cardiolipin) تشکیل شده است و برای AMPهای کاتیونی بسیار مناسب است (Lai and Gallo, 2009; Ebenhan et al., 2014). وجود اسیدهای تیکوئیک (Teichoic Acids) در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و لیپوپلی ساکارید (LPS) در غشای بیرونی باکتریایی گرم منفی، هر یک موجب افزایش بار منفی روی سطح باکتری‌ها می‌شوند (Yeaman and Yount, 2003).

بر اساس مطالعات متعدد منتشر شده، یک AMP معین می‌تواند برای برخی باکتری‌ها کشنده محسوب شود و در عین حال روی برخی موثر نباشد و به عبارت دیگر، فعالیت ضدباکتری بالاتری را نسبت به یک نوع باکتری خاص به نمایش گذارد (Masso-Silva and Diamond, 2014). به عنوان مثال، پپتید ضد میکروبی کاتلیسیتین جداسازی شده از روغن ماهی کاد آتلانتیک (*Gadus morhua*) (codCATH) علیه گونه‌های باکتریایی گرم منفی مورد بررسی، بسیار فعال بود، در

پس از تغلیظ با SPE و کسرگیری با حد عبور ۵ کیلودالتون صورت پذیرفت.

پژوهشگران زیادی پپتیدهای ضد میکروبی را از ترشحات اپیدرمی انواع ماهی‌ها جدا کرده‌اند (Masso-Silva and Diamond, 2014)، اما این میزان در برابر تعداد پپتیدهای شناسایی شده از ترشحات اپیدرمی دوزیستان و پستانداران ناچیز است. در این مطالعه برای اولین بار، فعالیت ضد میکروبی موکوس اپیدرمی گاو ماهی شنی دریای خزر که یکی از گونه‌های فراوان و بومی دریای خزر است، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که موکوس این ماهی و کسرهای آن، به ویژه کسرهای حاوی پپتیدهایی با وزن ملکولی کم، فعالیت ضدباکتریایی مناسبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا، به طور خاص گونه‌های گرم مثبت (*B. subtilis* و *S. aureus*) نشان دهنده مشارکت احتمالی پپتیدهای ضد میکروبی با وزن ملکولی پایین در فعالیت مزبور است.

جاذبه الکترواستاتیک بین AMPهای کاتیونی و سطح باکتری با بار منفی، عامل مهمی برای واکنش بین پپتیدها و غشای میکروبی هستند (Yeaman and Yount, 2003; Ebenhan et al., 2014). غشای سیتوپلاسمی

حالی که تقریباً علیه گونه‌های گرم مثبت، غیرفعال بود (Broekman et al., 2011). پپتید ضد میکروبی دیفنسین ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی در هشت گونه باکتری، از جمله پنج گونه گرم منفی (*Vibrio*, *E. coli*, *Vibrio*, *P. aeruginosa*, *fluviialis* و *anguillarum* و *Aeromonas sobria*) و سه سویه گرم مثبت (*Bacillus*, *S. aureus*) مورد آزمایش قرار گرفت و فعالیت ضدباکتری بالاتری را در برابر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت به نمایش گذاشت (Jin et al., 2010).

هپسیدین تیلایپیا (*Oreochromis mossambicus*) (TH1-5) ۱-۵ فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم منفی (*Vibrio* و *Listeria monocytogenes*) و باکتری‌های گرم مثبت (*vulnificus* و *Enterococcus faecium*, *S. aureus*) را اعمال می‌کند، در حالی که هپسیدین تیلایپیا ۲-۳ (TH2-3) تنها فعالیت ضدباکتری را در برابر باکتری‌های گرم منفی (*Vibrio damsela*) و

(*Vibrio vulnificus*) اعمال می‌کند (Huang et al., 2007; Pan et al., 2011). MAPP ماهی لوچ (*Misgurnus anguillicaudatus*) فعالیت ضد میکروبی خوبی را در برابر *B. subtilis*، *E. coli* و *S. aureus* با فعالیت قوی‌تری علیه *B. subtilis* نشان داد، اما موفق به مهار رشد کپک و مخمر نبود (Dong et al., 2002). باکتری‌های بیماری‌زا ماهی مانند *Aeromonas salmonicida*، *Yersinia ruckeri* و *V. anguillarum* نسبت به میکسیدین (Myxinidin) هاگ فیش (*Myxine glutinosa*) بسیار حساس هستند، اما اثر کمتری بر *Staphylococcus epidermidis* و *P. aeruginosa* دارد (Subramanian et al., 2009).

بر خلاف مطالعات ذکر شده، در این مطالعه فعالیت ضدباکتریایی تنها علیه گونه‌های گرم مثبت مشاهده شد که می‌توان به سهم بالاتر فسفاتیدیل گلیسرول با بار منفی در غشای باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اشاره کرد (Malanovic and Lohner, 2016). به عنوان مثال دو باکتری گرم مثبت *S. aureus* و *B. subtilis* که در این

به طور کلی نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده قابلیت بالای موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر به عنوان یک منبع غنی از پپتیدهای ضد میکروبی است که می‌تواند به واسطه مطالعات تکمیلی و در آینده نزدیک در حوزه سلامت آبزی پروری و حتی انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از سرکار خانم اشراقی مسئول آزمایشگاه PBRL دانشگاه تهران، مدیریت ماهیان خاویاری استان گلستان و به ویژه جناب آقای علی خوزنی برای پشتیبانی بی‌دریغ از این پژوهش، تشکر و قدردانی شود.

مطالعه حساس به عصاره موکوس اپیدرمی گاوماهی شنی دریای خزر بودند، به ترتیب دارای ۴۳ و ۷۰ درصد فسفاتیدیل گلیسرول هستند (Malanovic and Lohner, 2016). بنابراین پیش‌بینی می‌شود که جزء فعال دارای بار مثبت بالایی باشد که منجر به برهم‌کنش قوی، به ویژه با باکتری‌های گرم مثبت این چینی شده است. علاوه بر این، مطالعات مذکور نشان می‌دهند که فعالیت ضد میکروبی یک AMP به عوامل مختلفی از قبیل ویژگی‌های ساختاری آن مانند بار مثبت، آبگریزی، آمفی‌پاتیک بودن، توالی، اندازه، ساختار ثانویه، غلظت AMP، نوع عامل بیماری‌زا، سویه‌های میکروبی و منشا سویه‌های میکروبی (آب شور یا شیرین) بستگی دارد.

منابع

- Al-Rasheed A., Handool K.O., Garba B., Noordin M.M., Bejo S.K., Kamal F.M. and Daud H.H.M. 2018.** Crude extracts of epidermal mucus and epidermis of climbing perch *Anabas testudineus* and its antibacterial and hemolytic activities. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 44(2): 125–129.
- Antonoli P., Bachi A., Fasoli E. and Righetti P.G. 2009.** Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map analysis. Journal of Chromatography A, 216: 3606–3612.
- Bergsson G., Agerberth B., Jornvall H. and Gudmundsson G.H. 2005.** Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). The FEBS Journal, 272(19): 4960–4969.
- Birkemo G.A., Luders T., Andersen O. Nes I.F. and Nissen-Meyer J. 2003.** Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Biochimica et Biophysica Acta- Proteins and Proteomics, 1646(1-2): 207–215.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.
- Broekman D.C., Zenz A., Gudmundsdottir B.K., Lohner K., Maier V.H. and Gudmundsson G.H. 2011.** Functional characterization of codCath, the mature cathelicidin antimicrobial peptide from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Peptides, 32(10): 2044–2051.
- Cabello F.C., Godfrey H.P., Buschmann A.H. and Dolz H.J. 2016.** Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. The Lancet Infectious Diseases, 16(7): 127–133.
- Cabello F.C., Godfrey H.P., Tomova A., Ivanova L., Dolz H., Millanao A. and Buschmann A.H. 2013.** Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Environmental Microbiology, 15(7): 1917–1942.
- Cole A. M., Weis P. and Diamond G. 1997.** Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. Journal of Biological Chemistry, 272(18): 12008–12013.
- Dong X.Z., Xu H.B., Huang K.X., Liou Q. and Zhou J. 2002.** The preparation and characterization of an antimicrobial polypeptide from

- the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Protein Expression and Purification, 26(2): 235–242.
- Ebenhan T., Gheysens O., Kruger H.G., Zeevaart J.R. and Sathekge M.M. 2014.** Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed Research International*, 2014(3): 1–15 (67381).
- Ellis A.E. 2001.** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9): 827–839.
- Esteban M.A. 2012.** An overview of the immunological defenses in fish skin. *International Scholarly Research Notices*, 2012: 1–29 (853470).
- Fernandes J.M., Kemp G.D., Molle M.G. and Smith V.J. 2002.** Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemical Journal*, 368(2): 611–620.
- Fernandes J.M., Molle G., Kemp G.D. and Smith V.J. 2004.** Isolation and characterisation of oncorhynchin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(2): 127–138.
- Fernandes J.M., Saint N., Kemp G.D. and Smith V.J. 2003.** Oncorhynchin III: A potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemical Journal*, 373(2): 621–628.
- Garcia-Rodriguez S., Castilla S.A., Machado A. and Ayala A. 2003.** Comparison of methods for sample preparation of individual rat cerebrospinal fluid samples prior to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Biotechnology Letters*, 25(22): 1899–1903.
- Hellio C., Pons A.M., Beaupoil C., Bourgougnon N. and Le Gal Y. 2002.** Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(3): 214–219.
- Huang P.H., Chen J.Y. and Kuo C.M. 2007.** Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. *Molecular Immunology*, 44(8): 1922–1934.
- Jin J.Y., Zhou L., Wang Y., Li Z., Zhao J.G., Zhang Q.Y. and Gui J.F. 2010.** Antibacterial and antiviral roles of a fish β -defensin expressed both in pituitary and testis. *PLoS One*, 5(12): 1–14 (e12883).

- Lai Y. and Gallo R.L. 2009.** AMPed up immunity: How antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30(3): 131–141.
- Liang Y., Guan R., Huang W. and Xu T. 2011.** Isolation and identification of a novel inducible antibacterial peptide from the skin mucus of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *The Protein Journal*, 30(6): 413–421.
- Luders T., Birkemo G.A., Nissen-Meyer J., Andersen O. and Nes I.F. 2005.** Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone H1 N-terminal peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6): 2399–2406.
- Magnadottir B. 2006.** Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2): 137–151.
- Malanovic N. and Lohner K. 2016.** Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals*, 9(3): 1–33 (59).
- Masso-Silva J.A. and Diamond G. 2014.** Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, 7(3): 265–310.
- Ming L., Xiaoling P., Yan L., Lili W., Qi W., Xiyong Y., Boyao W. and Ning H. 2007.** Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. *Human Reproduction*, 22(7): 1810–1815.
- Nakanishi T., Toda H., Shibasaki Y. and Somamoto T. 2011.** Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12): 1317–1323.
- Nakatsuji T. and Gallo R.L. 2011.** Antimicrobial peptides: Old molecules with new ideas. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3-2): 887–895.
- O’neill J.I.M. 2014.** Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, 20: 1–16.
- Oren Z. and Shai Y. 1996.** A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *European Journal of Biochemistry*, 237(1): 303–310.
- Pan C.Y., Peng K.C., Lin C.H. and Chen J.Y. 2011.** Transgenic expression of tilapia hepcidin 1-5 and shrimp chelonianin in zebrafish and their resistance to bacterial pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, 31: 275–285.
- Park I.Y., Park C.B., Kim M.S. and Kim S.C. 1998.** Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters*, 437(3): 258–262.

- Pukala T.L., Bowie J.H., Maselli V.M., Musgrave I.F. and Tyler M.J. 2006.** Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: Structure and activity. *Natural Product Reports*, 23(3): 368–393.
- Rajanbabu V. and Chen J.Y. 2011.** Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32(2): 415–420.
- Rakers S., Niklasson L., Steinhagen D., Kruse C., Schaubert J., Sundell K. and Paus R. 2013.** Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: Perspectives for investigative dermatology. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(5): 1140–1149.
- Rico A., Phu T.M., Satapornvanit K., Min J., Shahabuddin A.M., Henriksson P.J., Murray F.J., Little D.C., Dalsgaard A. and Van Den Brink P.J. 2013.** Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412: 231–243.
- Robinson T.P., Wertheim H.F., Kakkar M., Kariuki S., Bu D. and Price L.B. 2016.** Animal production and antimicrobial resistance in the clinic. *The Lancet*, 387(10014): 9–15.
- Sang Y. and Blecha F. 2008.** Antimicrobial peptides and bacteriocins: Alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews*, 9(2): 227–235.
- Schaggerand H. and Von Jagow G. 1987.** Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, (166): 368–379.
- 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 (B)*, 158(2): 149–154.
- Subramanian S., MacKinnon S.L. and Ross N.W. 2007.** A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)*, 148(3): 256–263.
- Subramanian S., Ross N.W. and MacKinnon S.L. 2009.** Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine Biotechnology*, 11(6): 748–757.
- Valero Y., Chaves-Pozo E., Meseguer J., Esteban M.A. and Cuesta A. 2013.** Biological role of fish antimicrobial peptides. P: 31–60. In: Seong M.D., Hak Y.I.

- (Eds.). *Antimicrobial Peptides*. Nova Science Publishers.
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A. and Laxminarayan R. 2015.** Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18): 5649–5654.
- Vennila R., Kummar K.R., Kanchana S., Arumugam M. and Vijayalakshmi S. 2011.** Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingray. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2): 239–243.
- WHO (World Health Organization). 2017.** Antibacterial agents in clinical development: An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. World Health Organization, Switzerland. 45P.
- Whyte S.K. 2007.** The innate immune response of finfish- A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(6): 1127–1151.
- Yeaman M.R. and Yount N.Y. 2003.** Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1): 27–55.
- Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutierrez-De Frias C. and Cortes A. 2006.** Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2): 126–136.
- Zellner M., Winkler W., Hayden H., Diestinger M., Eliassen M., Gesslbauer B., Miller I., Chang M., Kungl A., Roth E. and Oehler R. 2005.** Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*, 26: 2481–2489.



Research Paper

Screening of epidermal mucus from *Neogobius fluviatilis pallasii* for finding antimicrobial peptides

Mohammad Akhavan Bahabadi^{1,2*}, Hamed Paknejad³, Mehran Habibi Rezaei⁴, Seyed Ali Akbar Hedayati⁵, Hamid Moghimi⁶

Received: March 2020

Accepted: May 2020

Abstract

In recent years the advent and spread of diverse multidrug-resistant bacteria have been the main object of concern to the medical field and public health. Antimicrobial peptides (AMPs) which are short chain, usually positive charge and hydrophobic molecules, are observed in an extensive array of life forms from prokaryotes to eukaryotes including humans. Introducing the group of molecules has been promising as that has some benefits over the significant world well-being concerns. This research describes the antimicrobial activity of the epidermal exudates extract of *Neogobius fluviatilis pallasii* and its size-based fractionations for the first time. The results showed that epidermal mucus extract and its fractionations were toxic to *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* with a radial of inhibition 12.25 and 19.25 mm, respectively. However, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Yersinia ruckeri* were resistant. Proteolytic treatment with proteinase K led to depleting the antibacterial properties of fractions, indicating that the active agent possesses a proteinaceous nature. Overall, these results propose that epidermal mucus of Caspian sand goby is a rich and valuable source for finding novel AMPs with potential applications in aquaculture and medicine.

Key words: *Antibiotic Resistance, Antimicrobial Peptides, Mucosal Immunity, Neogobius.*

1- Ph.D. in Aquaculture, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Ph.D. in Aquaculture, National Research Center of Saline Water Aquatics, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bafq, Iran.

3- Associate Professor in Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- Professor in Department of Cell and Molecular Biology, Protein Biotechnology Research Lab (PBRL), School of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.

5- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

6- Associate Professor in Department of Microbiology, School of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: akhavanm@ut.ac.ir