Informatics in Biology, Health, and Food

Interdisciplinary Explorations in Life Science

Volume 2. Number 1. Jun. 2025 DOI:10.22034/ibhf.2025.519747.1024

Original Article

Investigation of the Biological Effects of Persian Gulf Catfish Epidermal Mucus

Alireza Jamshidi[1,2], Somayyeh Gharibi*[3,1], Mahnaz Gholipour-Shahraki*[1], Safiyeh Momeni [3], Amir Vazirizadeh[4], Fatemeh Razeh[5]

[1] Biology Department, Faculty of Science, Kherad Institute of Higher Education, Bushehr, Iran.

[2] Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Bushehr, Iran.

[3] Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, 75147, Iran.

[4] Department of Fishery and Marine Biology, Persian Gulf Research and Studies Institute, Persian Gulf University, Bushehr, 7516913818.

[5]Department of Bioinformatics, University of Tehran, Kish International Campus, Kish, Iran.

Received: 2025/04/28 **Accepted:** 2025/06/09 **Online Published:** 2025/06/16

Abstract

Antibiotic resistance continues to rise due to frequent and often indiscriminate use of antimicrobial agents. This escalating challenge has intensified the need to discover new, safer, and more effective antibiotics. Marine ecosystems and their organisms represent a rich source of bioactive compounds and have recently attracted significant research attention. The mucous layer covering fish skin contains numerous antimicrobial components that serve as the first line of defense against invading pathogens. This study investigated the biological effects of epidermal mucus from Persian Gulf catfish (*Arius dussumieri*). Catfish were collected from the coastal waters Bushehr, and their epidermal mucus bacterial was extracted. Bacterial susceptibility testing was performed using the disk diffusion method against various clinical and standard bacterial strains. The proteolytic and hemolytic activities of the epidermal mucus were also examined evaluated. The proteolytic and hemolytic activities of the epidermal mucus were also examined. The results demonstrated that among Gram-positive bacteria, only *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 showed an inhibition zone in response to the catfish mucus. Among Gram-negative bacteria, inhibition zones were observed only for *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella* spp. Furthermore, bacteria exposed to the catfish mucus demonstrated reduced capacity for weak biofilm formation. No proteolytic or hemolytic activity in was detected in the epidermal mucus. These findings indicate that catfish mucus can inhibit the growth of certain bacteria and reduce their biofilm formation capacity. Its combination with industrial antibiotics may enhance antimicrobial efficacy. Evaluation of this compound against pathogenic bacterial and fungal strains in aquatic organisms is recommended, and it may serve as a promising source of natural antimicrobial compounds for further investigation.

Keywords: Epidermal mucus, Catfish, *Arius dussumieri*, Biofilm, Protease, Hemolysis.

Cite this article: Jamshidi A, Gharibi S, Gholipour-Shahraki M, Momeni Safari Kouchi S, Vazirizadeh A, Razeh F. Investigation of the biological effects of Persian Gulf catfish epidermal mucus. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(1):56-67.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding authors: Somayyeh Gharibi **Email**: gharibi.somayyeh@gmail.com

Mahnaz Gholipour **Email**: mahnaz.gholipour@gmail.com

انفورماتیک در زیست‌شناسی، بهداشت و غذا
کاوش‌های بین رشته‌ای در علوم زیستی

دوره ۲. شماره ۱. خرداد ۱۴۰۴ DOI:10.22034/ibhf.2025.519747.1024

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات بیولوژیکی مخاط اپیدرمی گربه ماهی خلیج فارس

علیرضا جمشیدی[۲،۱] ، سمیه غریبی*[۱،۳]، مهناز قلی‌پور شهرکی*[۱]، صفیه مومنی[۳]، امیر وزیری‌زاده[۴]، فاطمه رازه[۵]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، مرکز آموزش عالی خرد، بوشهر، ایران،
[۲] مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزش و پژوهش پزشکی انتقال خون، بوشهر، ایران.
[۳] مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ۷۵۱۴۷، ایران.
[۴] گروه شیلات و زیست شناسی دریا، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.
[۵] گروه بیوانفورماتیک، دانشگاه تهران، پردیس بین‌المللی کیش، کیش، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۲/۸ **پذیرش:** ۱۴۰۴ /۳/۱۹ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۴/۳/۲۶

چکیده

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دلیل استفاده مکرر و اغلب بی رویه‌ی آن‌ها در حال افزایش است. این مشکل نیاز به جستجوی آنتی‌بیوتیک‌های جدید، ایمن‌تر و مؤثرتر را تشدید کرده است. اکوسیستم و ارگانیسم‌های دریایی منبع ترکیبات زیستی بسیاری هستند که در مطالعات اخیر مورد توجه محقیق قرار گرفته است. لایه مخاطی روی سطح ماهی از چندین عامل ضدمیکروبی تشکیل شده است که اولین خط دفاعی را در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم فراهم می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات بیولوژیکی مخاط اپیدرمی گربه ماهی خلیج فارس انجام شد. پس از جمع آوری گربه ماهیاز سواحل شهر بوشهر و استخراج مخاط اپیدرمی ماهی، آزمون‌های تعیین حساسیت باکتریایی بر روی انواعی از باکتری‌های بالینی و استاندارد به روش انتشار دیسک صورت گرفت. همچنین اثر پروتئازی و همولیزکنندگی مخاط اپیدرمی مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که از بین باکتری‌های گرم مثبت تنها باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۶۳۳۹ نسبت به مخاط گربه هاله عدم رشد ماهی نشان داد. همچنین هاله‌ی عدم رشد تنها در سه باکتری گرم منفی *سالمونلا* ، *سراشیا مارسسنس و ویبریو کلرا* رؤیت شد. از سوی دیگر باکتری‌ها در مجاورت مخاط گربه ماهی قادر به تشکیل بیوفیلم (با روش کریستال ویوله) ضعیف بودند. در این مطالعه مخاط اپیدرمی گربه ماهی فاقد خاصیت پروتئازی و همولیزکنندگی بود. این مطالعه نشان داد که مخاط گربه ماهی می‌تواند از رشد برخی باکتری‌ها بکاهد و در کاهش قدرت تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها موثر است. به نظر می‌رسد استفاده از مخاط پوست گربه ماهی در کنار آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی می تواند در افزایش تاثیرگذاری این آنتی‌بیوتیک‌ها مؤثر باشد. ارزیابی این ترکیب جهت تأثیر بر سویه‌های باکتریایی و قارچی بیماری‌زای آبزیان توصیه می‌شود و می‌تواند به عنوان منبع ترکیبات ضد میکروبی طبیعی جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب گردد.

کلمات کلیدی: مخاط اپیدرم، گربه‌ماهی، *Arius dussumieri*، بیوفیلم، پروتئاز، همولیز.

Cite this article: Jamshidi A, Gharibi S, Gholipour-Shahraki M, Momeni Safari Kouchi S, Vazirizadeh A, Razeh F. Investigation of the biological effects of Persian Gulf catfish epidermal mucus. Informatics in Biology, Health, and Food. 2025;2(1):56-67.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding authors: Somayyeh Gharibi **Email**: gharibi.somayyeh@gmail.com
Mahnaz Gholipour **Email**: mahnaz.gholipour@gmail.com

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها برای میکروارگانیسم‌ها سیتوتوکسیک [1] یا سیتواستاتیک [2] هستند به این معنی که منجر به سمیت سلولی یا توقف چرخه‌ی سلولی شده و به سیستم ایمنی اجازه می‌دهند تا آن‌ها را از بین ببرد. آن‌ها اغلب با مهار سنتز پروتئین‌ها، اسید دئوکسی ریبونوکلئیک [3]، اسید ریبونوکلئیک [4] اثر ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کنند آنتی بیوتیک های مؤثر بر دیواره سلولی (مانند پنی‌سیلین) سنتز دیواره را مهار می کنند (۱). امروزه ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به تهدید جهانی تبدیل شده‌اند و مسئول مرگ و میر بالای بیماران و عفونت‌های مهلک هستند. سازمان بهداشت جهانی [5] هشدار داده است که اگر در مقابل مقاومت آنتی‌بیوتیکی راهکاری ارائه نشود، ممکن است آسیب‌های کوچک، منجر به عفونت شدید و در نهایت مرگ شود (۲). تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها راهکاری جهت حفظ و بقا میکروب‌ها در شرایط نامساعد محیطی است. با استفاده از این سازوکار مهم، باکتری‌ها می‌توانند از حمله و دفاع میزبان در امان بمانند. باکتری‌های مستقر در بیوفیلم مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، سموم شیمیایی، تنش‌های محیطی به ویژه تنش خشکی و تغییرات ناگهانی اسیدیته و دمای محیط زیست خود دارند. یک بیوفیلم می‌تواند توسط یک گونه باکتریایی ایجاد شود ولی معمولاً در تشکیل بیوفیلم ها گونه‌های مختلف باکتری دخالت دارند (۳). تشکیل بیوفیلم می‌تواند باعث بروز مشکلاتی در سلامت انسان، دام‌ها و گیاهان شود. مقاومت بیوفیلم نسبت به باکتری‌های تک سلولی پلانکتونی ۱۰۰۰ برابر بیشتر است به همین دلیل یکی از بزرگترین چالش‌های علم پزشکی، به شمار می‌رود (۴, ۵). امروزه جستجو برای یافتن ترکیبات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی از منابع مختلف حائز اهمیت ویژه‌ای است.

منابع طبیعی زیادی وجود دارد که می‌توان آن‌ها را به عنوان منابع آنتی‌بیوتیکی مورد کاوش و بررسی قرار داد. به عنوان مثال اقیانوس‌ها منبع ارزشمندی برای گروه بزرگی از محصولات طبیعی هستند. در حال حاضر برخی از ترکیبات دریایی وارد بازار شده‌اند که در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). یکی از این منابع ماهی‌ها هستند. ماهی‌ها دارای مکانیسم‌های دفاعی متمایز و پیچیده‌ای برای محافظت از خود در برابر عفونت‌های بیماری‌زا هستند که در میان آن‌ها مخاط پوست ماهی به عنوان اولین خط دفاع فیزیکی در برابر عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (۷, ۸). در ماهی، سطوح اپیتلیال توسط یک لایه لزج و لغزنده به نام موکوس پوشیده شده است که حاوی آنزیم‌های ضد باکتری، پروتئین‌ها، آب و غیره است. این ترکیب از دو جهت به عنوان جزئی مهم در مکانیسم ایمنی ذاتی عمل می‌کند. اولاً، با تولید مداوم و آبگیری منظم، از چسبیدن پاتوژن‌ها و کلونیزاسیون پایدار میکروب‌های عفونی و تهاجم انگل‌ها جلوگیری می‌کند. ثانیاً، حاوی تعدادی از عوامل ایمنی ذاتی مانند پروتئین‌ها و آنزیم‌های لیزوزیم، ایمونوگلوبولین، پروتئین‌های کمپلمان، لکتین‌ها، پروتئین واکنشگر C، آنزیم‌های پروتئولیتیک، انتقال دهنده، آلکالین فسفاتاز (ALP) [6] و سایر پروتئین‌های ضد باکتریایی است (۹). گربه ماهی [7] موسین یا موکوس تولید می‌کند که به صورت توده بزرگی از گلیکوپروتئین‌های با وزن مولکولی بالا در سطح بافت‌های اپیتلیال یافت می‌شوند و در آن‌جا به عنوان روان کننده و محافظ عمل می‌کنند. اسلایم حاوی پلی‌ساکاریدها و پپتیدهای جدید است که برخی از آن‌ها فعالیت ضد باکتری دارند.

بررسی هر ترکیب زیستی جهت شناسایی ساختار شیمیایی و عملکردی امری ضروری به نظر می‌رسد. این ارزیابی‌ها شامل بررسی مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره، ویژگی‌های ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی، سمیت سلولی، فعالیت پروتئازی و همولیزکنندگی و عملکردهای موثر بر سیستم ایمنی می‌باشد. دانش فعلی در مورد خواص ضد میکروبی مخاط ترشحی اپیدرم گربه ماهی بسیار محدود است (۱۰-۱۲). به همین دلیل این مطالعه با هدف بررسی اثرات بیولوژیکی مخاط اپیدرمی گربه ماهی خلیج فارس و ارزیابی امکان استفاده از آن به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گربه ماهی و آماده‌سازی

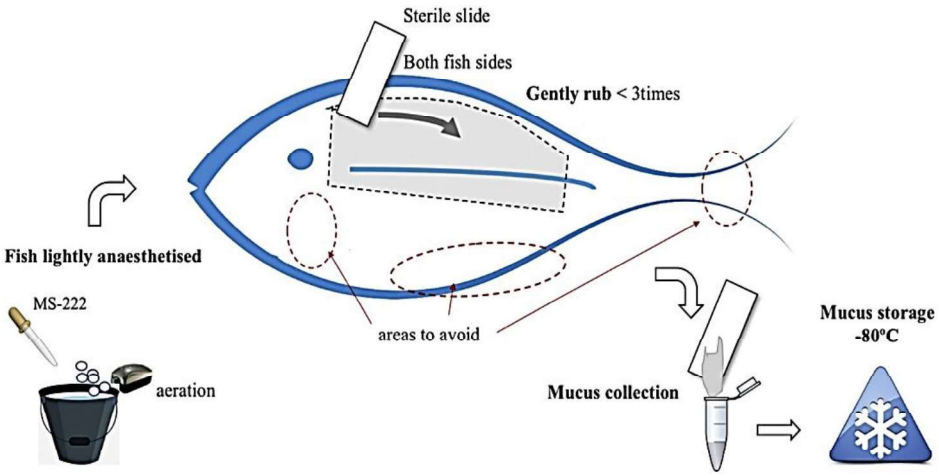
گربه ماهی متعلق به راسته گربه ماهی سانان [3] است. نام انگلیسی Sea catfish و نام فارسی آن گربه ماهی دریایی است. خانواده گربه ماهیان، اغلب دریازی و ندرتا ساکن آب شیرین بوده و دارای ۳۰ جنس و ۱۵۳ گونه در آب‌های نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری هستند. آن‌ها ساکن بسترهای گلی تا عمق ۵۰ متر و ندرتاً دراعماق بیشتر هستند. سه گونه *Arius dussumieri*،

[1] Cytotoxic
[2] Cytostatic
[3] DNA
[4] RNA
[5] World Health Organization (WHO)
[6] Alkaline phosphatase
[7] Catfish
[3] Siluriformes

Arius thalassinus و *Arius tenuispinis* در آب‌های ایران گزارش شده است.

نمونه‌برداری توسط قلاب و به صورت صید تصادفی طی یک نوبت در مهرماه از سواحل خلیج‌فارس در شهر بوشهر به مختصات طول جغرافیایی ′۳۵ °۵۰ شرقی و عرض جغرافیایی ′۲۹ º۰۰ شمالی انجام شد. گربه ماهی‌ها به نام علمی *Arius dussumieri* (۳۰ نمونه سالم و بدون بیماری با میانگین طولی ۴۵-۳۵ سانتی متر و میانگین وزنی ۸۰۰- ۲۵۰ گرم)، درون یونولیت حاوی یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل و پس از انتقال به آزمایشگاه مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، ابتدا با آب دریا و سپس با آب مقطر به طور سطحی شستشو داده شدند.

جمع‌آوری مخاط گربه‌ماهی



شکل۱. روش جمع‌آوری مخاط (۱۴)

Figure 1. Mucus collection protocol

با حرکت یک کفگیر پلاستیکی استریل در جهت خلفی، از سر به دم، مخاط را با دقت از سطح پشت بدن ماهی تراشیده و مخاط به لوله‌های استریل منتقل شد. برای از بین‌بردن آلودگی روده‌ای و ادراری - تناسلی از جمع شدن مخاط از ناحیه شکمی جلوگیری شد (شکل ۱). نمونه‌های مخاط پس از جمع آوری در لوله‌های استریل دریخ خشک نگه‌داری وسریعاً به آزمایشگاه منتقل و برای جلوگیری از رشد باکتری درفریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

آماده سازی موکوس

نمونه‌های موکوس که به طور اسپتیک از گربه ماهی جمع‌آوری شده بود، با مقدار مساوی سرم فیزیولوژی استریل به نسبت ۱:۱ مخلوط شده و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی برای مطالعات ضد میکروبی و سایر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵).

سویه‌های بالینی و استاندارد مورد بررسی

در این مطالعه از سویه‌های باکتریایی بالینی جمع‌آوری شده درآزمایشگاه میکروبیولوژی علوم پزشکی بوشهر، آزمایشگاه بیمارستان خلیج فارس بوشهر و آزمایشگاه میکروبیولوژی معاونت غذا و دارو بوشهر استفاده شد. همه‌ی سویه‌ها بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی مخصوص به جنس و گونه، در مراکز مربوطه تایید و احراز هویت شدند. همچنین برخی سویه‌های استاندارد نیز از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شده و همزمان با سویه‌های بالینی مورد بررسی قرار گرفتند.

سویه‌های بالینی مورد بررسی:

Staphylococcus aureus CAMP^{+}, *Staphylococcus saprophyticus, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa* U/C, *Citrobacter freundii, Corynebacterium diphtheriae, Pseudomonas aeruginosa* B/C, *Salmonella sp., Shigella flexneri, Vibrio, Enterococcus faecalis, Bacillus cereus, Shigella soneei, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae,*

سویه‌های استاندارد:

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus agalactiae* PTCC 1768, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus mirabilis* ATCC 4371, *Salmonella thyphimurium* ATCC 14029, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* ATCC 190606, *Yersinia enterocolitica* PTCC 1477, *Enterococcus faecalis* ATCC 1394, *Bacillus cereus*.

بررسی فعالیت ضد میکروبی با روش انتشار از دیسک

از بانک سویه‌های بالینی و استاندارد بر روی محیط آگار حاوی خون گوسفندی کشت شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت انکوباسیون قرار گرفت. پس از آماده‌سازی کشت‌ها، از هر سویه در محیط مولر هینتون براث موجود در لوله تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. به کمک سوآب از سوسپانسیون‌های ۰/۵ مک‌فارلند میکروبی تهیه شده روی سطح محیط مولرهینتون آگار یا مولر هینتون آگار با خون گوسفندی (برای سویه‌های سخت رشد)، کشت چمنی داده شد. با استفاده از پنس استریل دیسک‌های بلانک را با محلول مخاط گربه ماهی آغشته کرده و در سطح پلیت قرار داده شدند. برای اطمینان از نتیجه در ظروف پتری ۱۰۰ میلی‌متری، حداکثر تا ۵ عدد دیسک قرار داده شد. بدین ترتیب که یک عدد از دیسک‌ها بصورت کنترل منفی (از آب مقطر استفاده گردید) و یک عدد دیسک آنتی‌بیوتیک استاندارد (بسته به نوع باکتری استفاده شده از دیسک پنی‌سیلسن (۱۰ میکروگرم) برای گرم مثبت ها و از دیسک سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) برای گرم منفی‌ها) و سه عدد دیسک آغشته شده حاوی ۲۰ میکرولیتر مخاط تهیه شد. برای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، ظروف پتری به‌مدت ۲۴-۲۰ ساعت در دمای ۳۵±۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (۱۵). بنابر این هر تست آنتی‌بیوگرام ۳ بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار محاسبه گردید (۱۶).

بررسی تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های جداسازی شده

برای بررسی تولید بیوفیلم در باکتری از روش میکروتیترپلیت ۹۶ خانه با محیط مولرهینتون براث (MHB)[1] استفاده شد (۱۷). به منظور انجام آزمایش ابتدا باکتری‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند (*اشرشیا کلی*[2] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[3]) روی محیط بلادآگار کشت و ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تک کلنی رشد یافته را به محیط MHB تلقیح نموده و پس از انکوباسیون شبانه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از آن جهت تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند در محیط MHB جدید استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به هر چاهک پلیت میکروتیتر (۵ تکرار) اضافه شد. به چاهک کنترل منفی ۲۰۰ میکرولیتر محیط MHB اضافه گردید. به منظور حفظ رطوبت، یک ردیف چاهک دور تا دور پلیت را با مقداری آب دیونیزه پر و سپس به مدت چهار روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در روز چهارم، محتویات حفره‌ها در ظرف ساولن تخلیه و پلیت با آب دیونیزه استریل سه بار شستشو داده شد. سپس جهت رنگ‌آمیزی ساختار احتمالی تثبیت شده از رنگ کریستال ویوله ۱/ درصد استفاده گردید، به طوری که در هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ریخته و ۲۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. پس از تخلیه‌ی رنگ، پلیت سه بار با آب دیونیزه شستشو و تا زمان خشک شدن در دمای محیط قرار داده شد. در هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۰ درصد ریخته و ۲۰ دقیقه زمان داده شد. محتویات به میکروپلیت جدید منتقل و میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید (۱۸).

جدایه‌ها از نظر تولید بیوفیلم در چهار سطح منفی، تولیدکننده ضعیف، تولیدکننده متوسط و تولیدکننده قوی بدین گونه ارزیابی شدند: جذب نوری cutoff برابر است با میانگین ODc به اضافه‌ی ۳ برابر انحراف معیار ODc. جدایه‌هایی که میانگین جذب نوری آن‌ها کمتر از میانگین جذب نوری cutoff بود ($ODs^{4} \leq ODc^{5}$) از نظر تولید بیوفیلم، منفی در نظر گرفته شدند. جدایه‌هایی که میانگین جذب نوری آن‌ها بیشتر از

[1] Mueller Hinton Broth
[2] *E.coli*
[3] *Staphylococcus aureus*
[4] Optical Density of Sample
[5] Optical Density of Control

میانگین جذب نوری کنترل منفی و کمتر یا مساوی با ۲ برابر میانگین جذب نوری cutoff بودند (ODc< ODs≤ 2.ODc) تولیدکننده‌ی ضعیف بیوفیلم محسوب شدند. آن‌هایی که میانگین جذب نوری مساوی و یا کمتر از ۴ برابر میانگین جذب نوری کنترل منفی و بیشتر از ۲ برابر میانگین جذب نوری cutoff داشتند (2.ODc< ODs≤ 4.ODnc) تولیدکننده‌ی متوسط بیوفیلم بودند. جدایه‌هایی که میانگین جذب نوری بیشتر از ۴ برابر میانگین جذب نوری cutoff داشتند (4.ODc< ODs) تولیدکننده‌ی قوی بیوفیلم در نظر گرفته شدند (۱۹, ۲۰).

بررسی اثر همولیز مخاط

سنجش همولیز گلبول های قرمز گوسفند (RBC)[1] از روش Primor و Zlotkin استفاده شد. به همین منظور خون گوسفندی دفیبرینه در ۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و RBC ها ۳ بار با بافر PBS[2] شسته شدند. سلول‌ها تا ۱۰ درصد در PBS رقیق شده (هماتوکریت ۱۰درصد) و تا زمان استفاده در دمای ۲ تا ۵ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. هر محلول سنجش حاوی ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون RBC، ۵۰ میکرولیتر محلول مخاط مورد آزمایش و ۴۰ میکرولیتر PBS بود. همه نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند، سپس در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و جذب مایع رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همولیز به عنوان درصد هموگلوبین آزاد شده نسبت به مقدار بدست آمده از لیز با آب مقطر (۱۰۰٪ همولیز) به صورت زیر محاسبه شد. یک واحد همولیتیک (HU) مربوط به مقدار پروتئین کاتالیزور ۵۰ درصد همولیز RBCها است.

$$\text{Hemolysis} = [\text{OD Test} - \text{OD Saline}] / [\text{OD H2O} - \text{OD Saline}] \times 100$$

روش ارزیابی اثر پروتئازی

دراین بررسی از محیط کشت اسکیم میلک[3] ۵ درصد برای بررسی اثرپروتئازی استفاده شده است. ابتدا درمحیط کشت به تعداد ۵ عدد چاهک ایجاد کرده و در کف چاهک‌ها به جهت جلوگیری از نشت مواد مورد بررسی از آگار ذوب شده ریخته شد. دریک چاهک آب مقطر (کنترل منفی) ودر یک چاهک محلول رویی باسیلوس (کنترل مثبت) و درسه چاهک دیگر از مایع مخاطی به مقدار ۶۰ میکرولیتر ریخته شد. پس از گرماگذاری در ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت با ایجاد هاله در اطراف چاهک می‌توان به فعالیت پروتئولیتیک موکوس پی برد.

آنالیز آماری

آنالیزهای آماری مطالعه حاضر، توسط نرم افزار SPSS ورژن ۲۱ انجام گرفت.

نتایج

تعیین حساسیت باکتری با روش انتشار از دیسک

نتایج به دست‌آمده از کشت باکتری‌ها در محیط مولر- هینتون آگار به همراه دیسک‌های آغشته به مخاط، جهت بررسی اثر ضدباکتریایی مخاط ، دیسک آنتی‌بیوتیکی (کنترل مثبت) و دیسک آغشته به آب مقطر(کنترل منفی) به این ترتیب گزارش شد: همه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (۱۰۰درصد) به ترتیب هاله‌ی عدم رشد نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و سیپروفلوکساسین داشتند. از بین باکتری‌های گرم مثبت تنها یک باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۶۳۳۹ نسبت به مخاط گربه ماهی هاله عدم رشد نشان داد. همچنین هاله‌ی عدم رشد تنها در سه باکتری گرم منفی *سالمونلا*[4]، *سراشیا مارسسنس*[5] و *ویبریو کلرا*[6] رؤیت شد (جدول ۱ و شکل ۲).

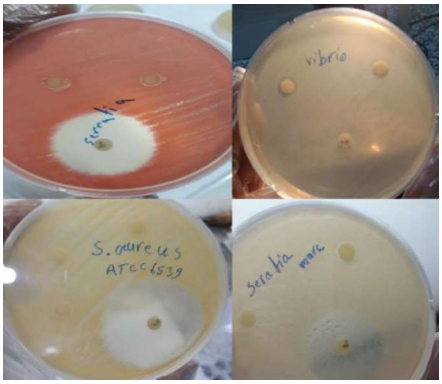
جدول۱. نتایج تست آنتی‌بیوگرام مخاط اپیدرمی گربه ماهی روی برخی از باکتری‌ها.

Table 1. Antibiogram results of catfish epidermal mucus against some bacteria.

باکتری‌های استاندارد	نمونه مخاط	کنترل مثبت[1]
S.aureus ATCC 6539	۸	۴۴
Salmonell Clinical	۷	۲۸
Serratia marcescens	۷	۳۳
Vibrio cholerae	۱۲	۲۵

[1] آنتی بیوتیک سیپروفلوکساین به عنوان کنترل مثبت برای باکتری‌های گرم منفی و پنی سیلین به عنوان کنترل مثبت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Red blood cell
[2] Phosphate-buffered saline
[3] Skim milk
[4] *Salmonella sp.*
[5] *Serratia marcescens*
[6] *Vibrio cholerae*



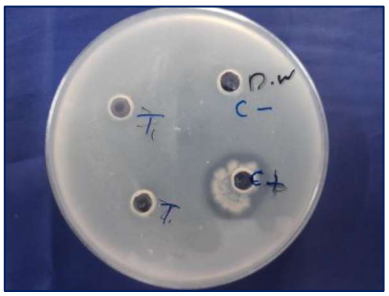
شکل ۲. نتایج تست آنتی‌بیوگرام مخاط اپیدرمی گربه ماهی روی برخی از باکتری‌ها.
Figure 2. Antibiogram results of catfish epidermal mucus against some bacteria.

نتایج ارزیابی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت

با توجه به جدول ۱ و با تفسیر نتایج الایزاریدر مشخص شد که باکتری‌ها در مجاورت مخاط گربه ماهی قادر به تشکیل بیوفیلم ضعیف بودند زیرا OD همه‌ی سویه‌ها از OD cutoff بیشتر بود. نمونه‌های E1,E2,E3 مربوط به باکتری *اشرشیا کلی* و S4، S5 و S6 مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. نمونه‌های E و S به ترتیب مربوط به باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط عدم حضور مخاط می‌باشند.

بررسی فعالیت پروتئازی

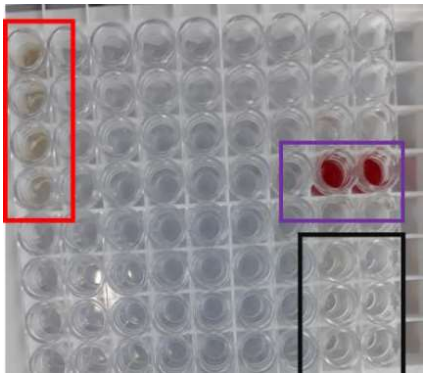
با توجه به شکل۳ هاله‌ی روشن اطراف چاهک حاوی مخاط اپیدرمی نشان‌دهنده‌ی عدم توانایی تجزیه‌ی کازئین بوده است و به همین دلیل، تست منفی گزارش شد.



شکل ۳. فعالیت پروتئازی مخاط اپیدرمی گربه ماهی.
Figure 3- Proteolytic activity of catfish epidermal mucus.

تست فعالیت همولیزی

همانطور که در شکل۴ مشاهده می‌شود، موکوس اپیدرمی گربه ماهی فاقد خاصیت همولیزی بود.



شکل ۴. فعالیت همولیزی مخاط اپیدرمی گربه ماهی. کادر قرمز کنترل منفی، کادر سیاه تست، کادر بنفش کنترل مثبت
Figure 4. Hemolytic activity of catfish epidermal mucus.Red box: Negative control, Black box: Test sample, Purple box: Positive control.

بحث

در سال‌های اخیر، علاقه به خواص ضدمیکروبی مخاط پوست ماهی افزایش یافته است. این مخاط نقش مهمی در مقاومت در برابر میکروب‌هایی ایفا می‌کند که می‌توانند میکروبیوم مخاطی ماهی را تغییر داده و ماهی را آسیب‌پذیرتر کنند. به نظر می‌رسد که اثر ضد میکروبی مخاط گزینه‌ی خوبی برای توسعه عوامل درمانی جدید برای درمان عفونت در انسان باشد و تعداد گونه‌های دریایی مورد مطالعه در جستجوی متابولیت‌های ثانویه در حال

افزایش است. در مقایسه با گونه‌های خشکی تخمین زده شد که میزان موفقیت در یافتن متابولیت‌های جدید در موجودات دریایی ۵۰۰ برابر بیشتر است (۲۱).

در پژوهش حاضر، همه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب هاله‌ی عدم رشد نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و سیپروفلوکساسین داشتند. از بین باکتری‌های گرم مثبت تنها یک باکتری *استاف اورئوس* ۶۵۳۹ نسبت به مخاط گربه‌ماهی هاله عدم رشد نشان داد. همچنین هاله‌ی عدم رشد تنها در سه باکتری گرم منفی *سالمونلا*، *سراشیا مارسسنس* و *ویبریو کلرا* رؤیت شد.. از سوی دیگر باکتری‌ها در مجاورت مخاط گربه ماهی قادر به تشکیل بیوفیلم ضعیف بودند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مخاط اپیدرمی گربه‌ماهی خلیج فارس[1] دارای اثرات ضدمیکروبی انتخابی علیه برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است و همچنین می‌تولند از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کند. این یافته‌ها با مطالعات پیشین در خصوص گونه‌های دیگر گربه‌ماهی هم‌راستا است. برای مثال، مخاط گونه‌های *Clarias gariepinus* و *Pangasianodon hypophthalmus* در مطالعات مختلف فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌هایی *کلبسیلا پنومونیه*[2]، *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده‌اند (۲۲-۲۴).

در مخاط گونه‌های مذکور، پپتیدها و پروتئین‌های ضدباکتریایی همچون پارازین I[3] نقش کلیدی در مهار رشد باکتری‌ها دارند، بدون آن‌که همولیز گلبول‌های قرمز انسانی را ایجاد کنند (۲۵). این در حالی است که در مطالعه حاضر، مخاط گربه‌ماهی خلیج فارس فاقد خاصیت همولیزکنندگی و پروتئازی بود که می‌تواند از نظر ایمنی زیستی یک مزیت محسوب شود. همچنین آنزیم‌هایی نظیر لیزوزیم، که در مخاط گونه‌های دیگر گزارش شده‌اند، نیز از جمله عواملی هستند که در تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها مشارکت دارند (۲۶).

شیخ‌زاده و همکاران (۱۳۹۱) تایید کردند که موکوس این ماهیان در برابر باکتری *یرسینیا راکری*[4] دارای خاصیت ضدباکتریایی است (۲۷). Raja و همکاران در سال ۲۰۲۰ به تجزیه و تحلیل خواص ضد باکتریایی و همولیتیک مخاط اپیدرمی از گربه ماهی دریایی *Tachysurus dussumieri* پرداختند. طی این مطالعه بیشترین ناحیه مهار در *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۷ ± ۱۵/۶۱ میلی‌متر) و پس از آن *باسیلوس سوبتیلیس*[5] (۰/۳۲ ± ۸/۳۲ میلی‌متر) و *اشرشیا کلی* (۰/۰۸ ± ۸/۱۴ میلی‌متر) مشاهده شد. جالب توجه است که موکوس *T. dussumieri* فعالیت همولیتیک را بر روی نمونه‌های مختلف خون بز، موش صحرایی، گوسفند، گاومیش، خرگوش، گاو، مرغ و انسان نشان داد (۲۸). بین عصاره موکوس *P. sophore* و جنتامایسین برای *کلبسیلا پنومونیه*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروجینوزا*[6] اثر هم افزایی مشاهده شد. یافته‌ها فعالیت‌های زیستی قوی عصاره موکوس *P. sophore* را برای اولین بار نشان داد و ثابت کرد که این ترکیب می‌تواند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها یا عوامل آنتی‌بیوفیلم سنتز شده شیمیایی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. در این مطالعه MIC و MBC در *اشرشیا کلی* معادل ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در *سودوموناس ائروجینوزا* معادل ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۲۹). در یک مطالعه گلیکوپروتئین گربه ماهی (CFG) از مخاط پوستی گربه ماهی مصری توسط رسوب سولفات آمونیوم استخراج و بر روی ستون فیلتراسیون ژل (Sephadex G-50) خالص شد. این ترکیب فعالیت ضدباکتریایی در برابر ۹ باکتری بیماری‌زا با MIC پایین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) را نشان داد، که در آن دو باکتری گرم مثبت *لیستریا ایوانووی*[7] و *استافیلوکوکوس پیوجنز*[8] حساس‌ترین بودند (۳۰) Balaraman و همکاران در جورجیا در سال ۲۰۲۰، مطالعه‌ای بر روی جداسازی و شناسایی پپتیدهای فعال زیستی از مخاط اپیدرم گربه ماهی *Mystus gulio* انجام دادند و نتایج نشان داد که این ترکیب اثر ضدمیکروبی روی *A. hydrophila* دارد (۳۱).

بررسی قدرت زیستی موکوس اپیدرم ماهی هامور چرب یا *Epinephelus tauvina* حداکثر منطقه مهار ۰/۳± ۲۶ میلی‌متر در برابر *پروتئوس میرابیلیس*[9] را نشان داد. در حالی که در بین پاتوژن‌های ماهی، بیشترین ناحیه مهار ۰/۱ ± ۲۵ میلی‌متر در برابر *ویبریوهمولیتیکوس*[10] مشاهده شد (۳۲). درسال ۲۰۱۴، Momohو همکاران به مطالعه‌ی ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی موسین اسلایم گربه ماهی بر روی میکروارگانیسم های منتخب با روش انتشار آگار در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. نتیجه آزمون حساسیت نشان داد که هم نمونه‌های موسین و هم نمونه‌های مرجع مهار بسیار قابل‌توجهی در برابر *اشرشیا کلی* و

[1] *Arius dussumieri*
[2] *Klebsiella pneumoniae*
[3] Parasin I
[4] *Yersinia ruckeri*
[5] *B. subtilis*
[6] *Pseudomonas aeruginosa*
[7] *Listeria ivanovi*
[8] *Staphylococcus pyogenes*
[9] *Proteus mirabilis*
[10] *V. hemolyticus*

استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد کردند که تأثیر بیشتری بر اولی نسبت به دومی داشت (۳۳).

در مطالعه‌ای تحت عنوان " پپتید ضد میکروبی از مخاط اپیدرمی برخی گربه ماهیان" پتانسیل فعالیت ضدمیکروبی ترشح پوست گربه ماهی در برابر ده باکتری بیماری‌زا نشان داده شد. نمونه مخاط پوست جمع‌آوری شده از دو نمونه از رشد پنج گونه باکتری گرم منفی (*اشرشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس ائروجینوزا* و *کلبسیلا اکسی توکا*[1]) جلوگیری کرد. از میان آن‌ها *اشرشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به ترشحات پوستی حساسیت زیادی داشتند. طیف فعالیت ضدباکتریایی در مخاط *A. maculatus* در برابر *اشرشیا کلی* حداکثر (۸ میلی‌متر) و در مقابل *کلبسیلا پنومونیه* حداقل (۶/۵ میلی‌متر) مشاهده شد. *M. gulio* حداکثر (۱۱ میلی‌متر) فعالیت را در برابر *سودوموناس ائروجینوزا* و حداقل (۱۰ میلی‌متر) در برابر *کلبسیلا اکسی توکا* مشاهده شد (۱۰). Subramanian و همکاران نیز به مقایسه‌ی خواص زیستی مخاط استخراج شده از چند ماهی پرداختند. عصاره‌های مخاطی اسیدی *S. fontinalis* ، *M. aeglefinus* و *M. glutinosa* فعالیت باکتری‌کشی نشان دادند. عصاره موکوس آلی *S. fontinalis*، *M. saxatilis* و *C. carpio* فعالیت باکتریواستاتیکی را نشان داد. هیچ فعالیت قابل تشخیصی در عصاره‌های مخاطی آبی وجود نداشت (۳۴).

Hellio و همکاران در سال ۲۰۰۲ به مطالعه‌ی فعالیت‌های ضد قارچی، ضد باکتریایی و سیتوتوکسیک موکوس اپیدرم و عصاره‌های اپیدرم ۱۳ گونه ماهی که از آب‌های اقیانوس اطلس شمالی صید می‌شوند، پرداختند. عصاره‌ها منجر به مهار رشد باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس ائروجینوزا*، *پروتئوس وولگاریس*[2]، . *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* [3] ، *باسیلوس سرئوس* [4] و گونه‌های *استرپتوکوک*[5] شد (۲۱).

مطالعه‌ی Ali و همکارن در سال ۲۰۲۳ نسان داد که ترکیبات استخراج شده با اتانول ۷۰درصد از مخاط پوست ماهیان کپور دارای ترکیبات فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی علیه پاتوژن‌های مهم آبزیان است (۱۱). همچنین مطالعه‌ی Bragadeeswaran و همکاران نیز نشان داد که استفاده از تیمارهای اولیه مانند امواج فراصوت یا آنزیم‌هایی مانند تریپسین و پروتئیناز K اثر ضد میکروبی مخاط را ممکن است افزایش دهد (۳۵). اما در نظر گرفتن این نکته ضروری است که این روش‌ها باعث افزایش چشمگیر هزینه‌ها در تولید یک ترکیب ضد میکروبی خواهند بود.

پروتئاز به گروهی از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود که عملکرد کاتالیزوری آن‌ها هیدرولیز پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها است و مخاط ماهی حاوی انواع پروتئازها است که نقش مهمی در مکانیسم‌های ایمنی ذاتی دارند. این پروتئازها اغلب مسئول تخریب پاتوژن‌ها و سایر مواد خارجی هستند. پروتئازها به طور گسترده به چهار دسته مانند پروتئازهای سرین، پروتئازهای سیستئین، پروتئازهای آسپارتیک و متالوپروتئازها طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئاز سرین به عنوان یکی از پروتئازهای مخاطی اصلی در چندین گونه ماهی مانند *Cirrhinus mrigala*، *Labeo rohita*، *Catla catla*، *Rita rita* و *Channa punctata* گزارش شده است و بیش از ۲۵ درصد از سیستم کمپلمان را تشکیل می‌دهد. در این مطالعه مخاط اپیدرمی گربه ماهی فاقد خاصیت پروتئازی بود (۳۶).

مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که مخاط گربه ماهی می‌تواند از رشد برخی باکتری‌ها بکاهد. همچنین اثر این ترکیب در کاهش تولید بیوفیلم در باکتری‌های *اشرشیا کلی* و. *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده شد. در یک بیوفیلم، سلول‌ها مکانیسم‌های متعددی را برای مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی مورد استفاده قرار می‌دهند و ترکیباتی که توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های بیماری‌زا را کاهش می‌دهند، در پیش‌گیری و درمان عفونت‌ها مؤثر هستند (۵).

از منظر تنظیم پاسخ ایمنی، مخاط اپیدرمی گربه ماهی‌ها حاوی ترکیباتی است که می‌توانند در جذب سلول‌های ایمنی مانند نوتروفیل‌ها و فیبروبلاست‌ها نقش داشته باشند. برای مثال، اسید چرب فورانی (F6) و متابولیت کلسترولی (S5) استخراج‌شده از مخاط *Arius bilineatus* موجب تحریک جذب سلول‌های ایمنی و تسریع در فرآیند ترمیم زخم شده‌اند (۳۷) . همچنین، بخش لیپیدی مخاط این گونه توانسته با کاهش سنتز ایکوزانوئیدهای التهابی نظیر PGE2 و تعدیل متابولیسم اسید آراشیدونیک، آثار ضدالتهابی قابل توجهی را از خود نشان دهد (۳۸).

گرچه در مطالعه حاضر تمرکز بر ویژگی‌های ضدباکتری و بیوفیلم‌زدایی بود و نه ترمیم زخم، با توجه به شباهت گونه‌ای، محتمل است که مخاط *Arius dussumieri* نیز دارای ترکیبات

[1] *Klebsiella oxytoca*
[2] *P. vulgaris*
[3] *B.subtilisv*
[4] *B. cereus*
[5] *Streptococcus*

لیپیدی و پپتیدی مؤثر در روند ترمیم زخم باشد. در مطالعات قبلی، مخاط گونه *Clarias gariepinus* در مدل حیوانی سبب افزایش مهاجرت سلولی و بازسازی بافتی شده است، به‌طوری‌که اثربخشی آن در بهبود زخم از بتادین نیز بیشتر بوده است (۲۲،۳۹).

نتیجه‌گیری

در مجموع، یافته‌های این تحقیق همراه با شواهد مطالعات پیشین، نشان می‌دهد که مخاط اپیدرمی گربه‌ماهی‌ها دارای پتانسیل قابل توجهی برای توسعه فرآورده‌های ضدمیکروبی طبیعی و عوامل کمکی در درمان عفونت‌ها و اختلالات التهابی هستند و رویکرد استفاده از مخاط پوست گربه ماهی در کنار آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی می‌تواند در افزایش تاثیرگذاری این آنتی‌بیوتیک‌ها موثر باشد با این حال، برای شناخت دقیق‌تر ترکیبات مؤثر موجود در مخاط *Arius dussumieri* و ارزیابی سمیت و اثربخشی آن در مدل‌های زیستی مختلف از جمله آبزیان، مطالعات مولکولی و فارماکولوژیک تکمیلی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه‌ی بزرگوارانی که در امر نمونه برداری و تهیه‌ی گربه ماهی خلیج فارس ما را یاری رساندند قدردانی می‌شود.

Refrances

1. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Frontiers in Microbiology.2010;1:134.doi:10.3389/fmicb.2010.00134
2. Aminov RI, Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. FEMS Microbiology Letters. 2007;271(2):147-161.doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x
3. Kokare C, Chakraborty S, Khopade A, Mahadik KR. Biofilm: Importance and applications. Indian Journal of Biotechnology. 2009;8(2):159-168. Not found; journal appears to use a non-DOI system.
4. Khezri M. Effects of biofilm formation in bacteria from different perspectives. Nova Biologica Reperta. 2019;6(1):70-78. https://nbr.khu.ac.ir/article-1-3044-en.html.
5. Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Oliyaei N. Anti-biofilm activity of marine algae-derived bioactive compounds. Frontiers in Microbiology. 2024;15:1270174. doi: 10.3389/fmicb.2024.1270174.
6. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. European Journal of Medicinal Chemistry. 2011;46(10):4769-4807. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.07.057
7. Díaz-Puertas R, Adamek M, Mallavia R, Falco A. Fish Skin Mucus Extracts: An Underexplored Source of Antimicrobial Agents. Marine Drugs. 2023;21(6):350. doi: 10.3390/md21060350
8. Álvarez CA, Toro-Araneda T, Cumillaf JP, Vega B, Tapia MJ, Roman T, et al. Evaluation of the Biological Activities of Peptides from Epidermal Mucus of Marine Fish Species from Chilean Aquaculture. Marine Drugs. 2024;22(6):248. doi: 10.3390/md22060248
9. Dash S, Das SK, Samal J, Thatoi HN. Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. Iranian Journal of Veterinary Research. 2018;19(2):72–81.doi: 10.22099/ijvr.2018.4849
10. Gobinath RAC, Ravichandran S. Antimicrobial peptide from the epidermal mucus of some estuarine cat fishes. World Applied Sciences Journal. 2011;12:256–260. No DOI assigned for this journal issue
11. Ali S, Nasir Khan Khattak M, Ullah W, Rauf M, Zaman S, Ullah Dawar F. Bactericidal activities and biochemical analysis of skin mucus of Cyprinid fish. Journal of King Saud University - Science. 2023;35(6):102731. doi: 10.1016/j.jksus.2023.102731
12. Hussain A, Sachan SG. Fish Epidermal Mucus as a Source of Diverse Therapeutical Compounds. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2023;29(3):36. doi: 10.1007/s10989-023-10505-6
13. Al-Lahham A, Al-Hassan JM, Thomson M, Criddle R. A hemolytic protein secreted from epidermal cells of the Arabian Gulf catfish, Arius thalassinus (Ruppell). Comparative Biochemistry and Physiology B. 1987;87(2):321–327. doi: 10.1016/0305-0491(87)90146-5
14. Fernández-Alacid L, Sanahuja I, Ordóñez-Grande B, Sánchez-Nuño S, Viscor G, Gisbert E, et al. Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species. Science of the Total Environment. 2018;644:1323–1335. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.083
15.Balasubramanian S, Prakash M, Senthilraja P, Gunasekaran G. Antimicrobial properties of skin mucus from four freshwater cultivable fishes (Catla catla, Hypophthalmichthys molitrix, Labeo rohita and Ctenopharyngodon idella). African Journal of Microbiology Research. 2012;6(24):5110–5120. doi: 10.5897/AJMR11.532
16. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal

of Pharmaceutical Analysis. 2016;6(2):71–79. No DOI found in online indexing; journal uses non-DOI system
17.Abdul-Lateef LA, Gatea AK, Jwad TS. Biofilm formation by Streptococcus agalactiae is affected by pH changes in vitro. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2018;10(12):3216–3218. DOI: Not assigned; indexed via ProQuest.
18. O'Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. Journal of Visualized Experiments (JoVE). 2011;(47):e2437. doi: 10.3791/2437
19. Kaur H, Kumar P, Ray P, Kaur J, Chakraborti A. Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. Microbial Pathogenesis. 2009;46(6):321–327.
doi: 10.1016/j.micpath.2009.04.004
20. Abdul-Hamza HK, Mohammed GJ. The inhibitory effect of some nanoparticles on biofilm formation of Streptococcus agalactiae. Al-Qadisiyah Journal Of Pure Science. 2019;24(2).
https://journalsc.qu.edu.iq/index.php/JOPS.
21. Hellio C, Pons AM, Beaupoil C, Bourgougnon N, Le Gal Y. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. International Journal of Antimicrobial Agents. 2002;20(3):214–219.doi: 10.1016/S0924-8579(02)00172-3
22. Akunne TC, Okafor SN, Okechukwu DC, Nwankwor SS, Emene JO, Okoro BN. Catfish (Clarias gariepinus) slime coat possesses antimicrobial and wound healing activities. Pharmaceutical and Biosciences Journal. 2016:81–87. doi:10.20510/ukjpb/4/i3/108393.
23.Lirio GAC, De Leon JAA, Villafuerte AG. Antimicrobial activity of epidermal mucus from top aquaculture fish species against medically-important pathogens. Walailak Journal of Science and Technology. 2019;16(5):329–340.
doi:10.48048/wjst.2019.6287
24. Gomathy M, Pappuswamy M. Wound Healing, Cell Viability and Antimicrobial Potency of Mucus from Pangasianodon hypophthalmus. Journal of Pure & Applied Microbiology. 2024;18(4).
doi:10.22207/JPAM.18.4.14
25. Kim SC, Park IY, Park CB. Antimicrobial peptide isolated from Parasilurus asotus and its uses. Google Patents. 2001.
https://patents.google.com/patent/US6316594B1/en.
26. Widiyani T, Astuti RD, Azizah RR, Listyawati S, Purwoko T, Budiharjo A, Setyaningsih R. (eds.) Antimicrobial potency of catfish (Clarias gariepinus) mucus. AIP Conference Proceedings. 2024.
27.Sheikhzadeh N, Heidarieh M, Pashaki AK, Nofouzi K, Farshbafi MA, Akbari M. Hilyses®, fermented Saccharomyces cerevisiae, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish & Shellfish Immunology. 2012;32(6):1083–1087. doi: 10.1016/j.fsi.2012.03.003
28. Raja K, Jayakumar T, Sahayanathan GJ, Padmanaban D, Neelan K, Chinnasamy A. Evaluation of Anticancer, Antibacterial and Haemolytic Activities of Crude Mucus from Marine Catfish Tachysurus dussumieri. International Journal of Life Sciences and Pharma Research. 2020;10(2):38–45. doi:10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.2.L38-45
29. Patel M, Ashraf MS, Siddiqui AJ, Ashraf SA, Sachidanandan M, Snoussi M, et al. Profiling and Role of Bioactive Molecules from Puntius sophore (Freshwater/Brackish Fish) Skin Mucus with Its Potent Antibacterial, Antiadhesion, and Antibiofilm Activities. Biomolecules. 2020;10(6):920. doi: 10.3390/biom10060920
30.Abdel-Shafi S, Osman A, Al-Mohammadi A-R, Enan G, Kamal N, Sitohy M. Biochemical, biological characteristics and antibacterial activity of glycoprotein extracted from the epidermal mucus of African catfish (Clarias gariepinus). International Journal of Biological Macromolecules. 2019;138:773–780. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.041
31.Balaraman D, Subramanian V, George EGJ. Characterization of Bioactive Peptide Derived from Fish Mucus. In: Encyclopedia of Marine Biotechnology. 2020;3:1475–1492. doi:10.1002/9781119143802.ch62
32. Manikantan G, Lyla S, Khan SA, Vijayanand P, Jothi GEG. Bioactive potency of epidermal mucus extracts from greasy grouper, Epinephelus tauvina (Forsskal, 1775). Journal of Coastal Life Medicine. 2016;4:510–520. doi:10.12980/jclm.4.2016J6-34.
33. Momoh M, Mora A, Ogbonna J, Agboke A. In vitro evaluation of antimicrobial activity of cat fish slime mucin on selected micro-organisms by agar diffusion method. Pakistan Journal of Zoology. 2014;46(6):1747–1751.
34. Subramanian S, Ross NW, MacKinnon SL. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2008;150(1):85–92. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.01.011
35. Bragadeeswaran S, Priyadharshini S, Prabhu K, Rani SRS. Antimicrobial and hemolytic activity of fish epidermal mucus Cynoglossus arel and Arius caelatus. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2011;4(4):305–309. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60091-6
36. Kumari U, Nigam AK, Mitial S, Mitial AK. Antibacterial properties of the skin mucus of the freshwater fishes, Rita rita and Channa punctatus. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2011;15(7):781–786. PMID: 21780547
37. Al-Hassan JM, Hinek A, Renno WM, Wang Y, Liu YF, Guan R, et al. Potential mechanism of dermal wound treatment with preparations from the skin gel of Arabian Gulf catfish: A unique furan fatty acid (F6) and cholesta-3,5-diene (S5) recruit neutrophils and fibroblasts to promote wound healing. Frontiers in Pharmacology. 2020;11:899. doi: 10.3389/fphar.2020.00899
38. Yang P, Ding J, Tang L, Rhea P, Pan Y, Afzal M, et al. Anti-inflammatory, Anti-proliferative Activities from the Skin of the Catfish Arius bilineatus, Valenciennes. The FASEB Journal. 2016;30:612. doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.612.6
39. Widiyani T, Iriansyah AH, Listyawati S. Biological Activity of Catfish (Clarias gariepinus) Mucus Gel on the Wistar Rats (Rattus norvegicus) Wound Healing Process.

Tropical Journal of Natural Product Research. 2023. doi:
10.26538/tjnpr/v7i2.12.