بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی و مقایسه فراسنجه‌های ایمنی موکوس پوست و پلاسمای تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)

*حامد آزادی[۱]، حامد کلنگی میاندره[۲]، عبدالمجید حاجی مرادلو[۳] و مهدی عباسیان[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۴]دانشجوی دکتری گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی اصفهان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۲۲

چکیده

تحقیق حاضر با هدف مقایسه فراسنجه‌های ایمنی موکوس پوست تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) انجام شد. از تعداد ۲۰ عدد ماهی (۱۰ عدد از هر گونه) نمونه‌برداری موکوس و پلاسما صورت گرفت و فاکتورهای پروتئین محلول، لیزوزیم، فسفاتاز قلیایی و ایمونوگلوبولین کل در موکوس و پلاسمای دو گونه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان پروتئین محلول (گرم بر دسی‌لیتر)، ایمنوگلوبولین کل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آلکالین فسفاتاز (واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر) و لیزوزیم (واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر) موکوس و پلاسما در ماهی قره برون به‌ترتیب ۱,۱۱±۷,٦، ۰,۲٦±۸,٤٦، ۱,٤±۲۳، ۱,٦±۳۸، ۱,٤±۲۳، ۸,۷۷±۱۳٤,۰٦، ۱,۳±۲٤,۸ و ۱٦,۹۷±۸۵ و در ماهی چالباش به‌ترتیب ۰,۲٦±۸,٤٦، ۰,۷۵± ۹,۷۱، ۲,٤± ۱۹,٤، ۱,٤±۳٦,٦، ۲,۵٤±۲۳,۷، ۱۹,٦۸±۸۳,۷۰، ۰,۸±۱۳,٦۱ و ۱٤,۸۵±٤۹,۵ می‌باشد. میزان پروتئین محلول و ایمنوگلوبولین کل در هر دو نمونه موکوس و پلاسما و میزان آلکالین فسفاتاز بین

*مسئول مکاتبه: azadi404@gmail.com

موکوس دو گونه باهم تفاوت معنی‌داری نداشتند. (P>۰/۰۵) در حالی‌که مقدار لیزوزیم در موکوس و پلاسما و میزان آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های پلاسمای دو گونه باهم اختلاف معنی‌دار نشان دادند (P<۰/۰۵) همچنین بر اساس نتایج موجود هیچ فعالیت ضد باکتریایی در موکوس و پلاسمای دو ماهی چالباش و قره برون مشاهده نشد. به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که موکوس و پلاسما به‌عنوان یکی از اجزای مرتبط در ایمنی غیر اختصاصی به شمار می‌رود و در تحقیق حاضر سطح پارامترهای ایمنی در قره برون بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: پارامترهای ایمنی، فعالیت آنتی‌باکتریال، ماهیان خاویاری

مقدمه

موکوس پوست یک جزء کلیدی شامل ترکیبات متعددی از سیستم ایمنی ذاتی از جمله: لیزوزیم، پروتئازها، ایمونوگلوبولینها، لکتین و آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌باشد (سابرامانیان و همکاران، ۲۰۰۷). پروتئین‌های ساختاری اصلی موکوس گلیکوپروتئین‌هایی با حجم مولکولی زیاد هستند که موسین نامیده می‌شوند (تابک، ۱۹۹۵). همچنین سلول‌هایی موسوم به سلول‌های کیسه‌ای شکل در اپیدرم ماهیان، پروتئین‌هایی را ترشح می‌نماید که ماهیان را در برابر عفونت‌ها و آسیب‌های ناشی از انگل‌های خارجی حفاظت می‌نماید (سوزوکی و همکاران، ۲۰۰۳). سطح موکوس پوست و اپیدرم ماهی به عنوان اولین سد در مقابل عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند (شفرد، ۱۹۹٤، اینگرام، ۱۹۸۰؛ ایلز، ۲۰۰۱). لیزوزیم یک آنزیم ضد باکتری است که به‌طور گسترده در مایعات‌های بیولوژیکی بافت‌ها در طیف وسیعی از موجودات از جمله ماهی به خوبی مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

هنگامی که دیواره خارجی باکتری‌های گرم منفی در اثر عملکرد کمپلمان یا آنزیم‌های دیگر تخریب می‌گردد و لایه پپتیدوگلیکان باکتری ظاهر شود، لیزوزیم نیز به‌علت دسترسی به لایه داخلی پپتیدوگلیکان به‌طور مؤثری فعالیت نموده و باکتری را تخریب می‌کند (یانو، ۱۹۹٦). آنزیم فسفاتاز قلیایی یک آنزیم لیزوزومی بوده که بیشترین دامنه فعالیت آن در پی اچ قلیایی می‌باشد و در طول مراحل اولیه بهبود زخم‌ها و در شرایط استرس‌زا توسط سلول‌های اپیدرمی ترشح می‌شود و نقش حفاظتی را در برابر پاتوژن‌ها انجام می‌دهد (ایگر و ابراهام، ۱۹۹٤). در اکثریت گروه مهره‌داران آرواره‌دار، شامل ماهیان، سیستم ایمنی بر اساس مولکول‌های کلیدی تطابق می‌یابد مانند رسپتورهای

سلول‌های Ig، T (TCR) و بیشتر سازگاری بافتی پیچیده (MCH) پیشنهاد شده است که در اشتراک با سیستم‌های پستانداران، ایمینوگلوبولین‌ها گوناگون یا اختلاف در یکی ممکن است با ایمنی موکوسی در ماهیان وابسته باشد. (هردویک و همکاران، ۱۹۹۹) آنزیم فسفاتاز قلیایی یک آنزیم لیزوزومی بوده که بیشترین دامنه فعالیت آن در پی اچ قلیایی می‌باشد و در طول مراحل اولیه بهبود زخم‌ها و در شرایط استرس‌زا توسط سلول‌های اپیدرمی ترشح می‌شود و نقش حفاظتی را در برابر پاتوژن‌ها انجام می‌دهد (ایگر و ابراهام، ۱۹۹٤)

ماهیان خاویاری یکی از قدیمی‌ترین مهره‌داران روی زمین هستند که از حدود ۲۵۰ میلیون سال پیش تا کنون می زیسته‌اند و به لحاظ قدمت بسیار زیاد به آن‌ها فسیل‌های زنده اطلاق می‌شود. شش گونه از تاس ماهیان به اسامی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، تاسماهی روسی (*A.gueldenstadi*)، شیپ (*A.nudiventris*)، فیل ماهی (*Huso huso*)، ازون‌برون (*A. stellatus*) و استرلیاد (*A. ruthenus*) در دریای خزر و حوضه آبریز آن زیست می‌نمایند (چبانوف و النا، ۲۰۱۳). به‌طور کلی مطلعات انجام شده در زمینه ایمنی موکوس و پلاسما محدود می‌باشد و در زمینه ایمنی موکوس ماهیان خاویاری تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی و مقایسه پارامترهای ایمنی موکوس و پلاسمای قره‌برون و چالباش صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری موکوس: در این تحقیق از تعداد ۱۰ عدد ماهی از هر یک از گونه‌های تاس ماهی ایرانی و روسی براساس روش راس و همکاران (۲۰۰۰) جمع‌آوری شد. موکوس به دقت از سطح پشتی ماهی به وسیله لام یا قاشقک پلاستیکی استریل جمع‌آوری شد. موکوس جمع‌آوری شده به سرعت فریز شد و برای تحقیقات بیشتر به فریزر منفی ۸۰ منتقل گردید.

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم: اندازه‌گیری لیزوزیم براساس روش کدورت‌سنجی که به‌وسیله سابرامانیان و همکاران (۲۰۰۷). ارائه شده صورت گرفت. ۵۰ میکرولیتر از موکوس با بافر فسفات سدیم ٤۰ میلی‌مولار (pH=٦/٥) مخلوط شد و به پلیت ۹٦ خانه منتقل شده و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی

باکتری میکروکوکوس لوتئوس (۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باکتری در بافر فسفات سدیم ٤۰ میلی‌مولار، pH= 6.5) به آن اضافه شد و جذب آن‌ها طی ۵۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه خوانش شد.

اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل: جهت اندازه‌گیری توتال ایمونوگلبولین از روش سیویکی و آندرسون (۱۹۹۳) استفاده شد. ابتدا میزان پروتئین سرم و موکوس تعیین شده و سپس به نمونه موکوس پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲ درصد اضافه می‌شود. پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفوژ شده و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً توسط روش بردفورد اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول محاسبه شد.

سنجش میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی: سنجش میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی برای اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش لاوری و همکاران (۲۰۰۵) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده‌گردید. اندازه‌گیری با اضافه نمودن معرف رنگی فولین فنول سیوکالتیو به ۱۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت. با انتقال جذب نوری به دست‌آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. سطح آنزیم آلکالین فسفاتازقلیایی موکوس با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۱۵ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه تعیین شد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

محیط کشت باکتری: عصاره‌های موکوس در برابر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا[1] تهیه شده توسط صفری و همکاران (۲۰۱٦) تست شد. پاتوژن ماهی (*A.hydrophila*) در محیط کشت نوترینت براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند. پس از رشد باکتری در محیط کشت مایع نوترینت براث و تهیه استوک، به‌منظور مشاهده فعالیت ضد میکروبی از روش انتشار دیسک که توسط هلیو و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد.

1- Aeromonas hydrophila

حداقل غلظت مهارکننده[1]: موکوسی که فعالیت ضد میکروبی خود را نشان داد. مجدداً تحت آزمایش حداقل غلظت مهارکننده (MIC) قرار گرفت که نشان‌دهنده کمترین غلظت عصاره موکوس است که از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند. تست MIC با استفاده از روش میکرودایلوشن و دیسک گذاری به روش استاندارد تعیین شد که توسط سابرامانیان و همکاران (۲۰۰۸) شرح داده شده است.

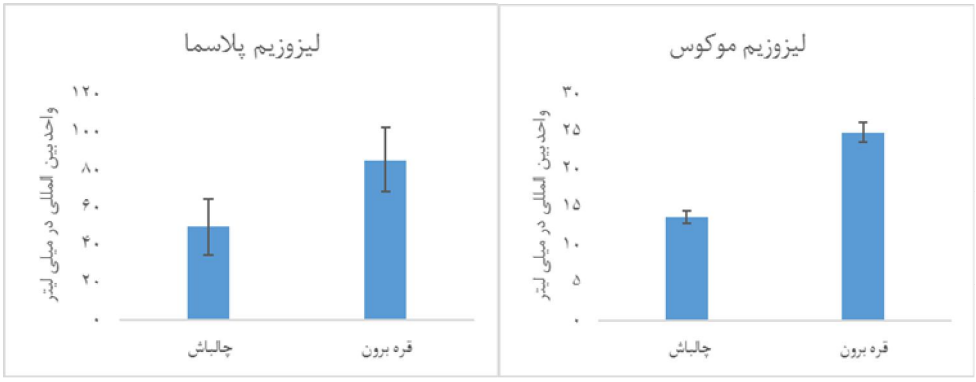
آنالیز آماری: پس از اندازه‌گیری شاخص‌های فوق ابتدا نرمال بودن داده با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد و برای مقایسه بین تیمارهای آزمایشی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA در سطح احتمال (P<۰/۰۵) استفاده شد. آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۲) انجام شد.

نتایج و بحث

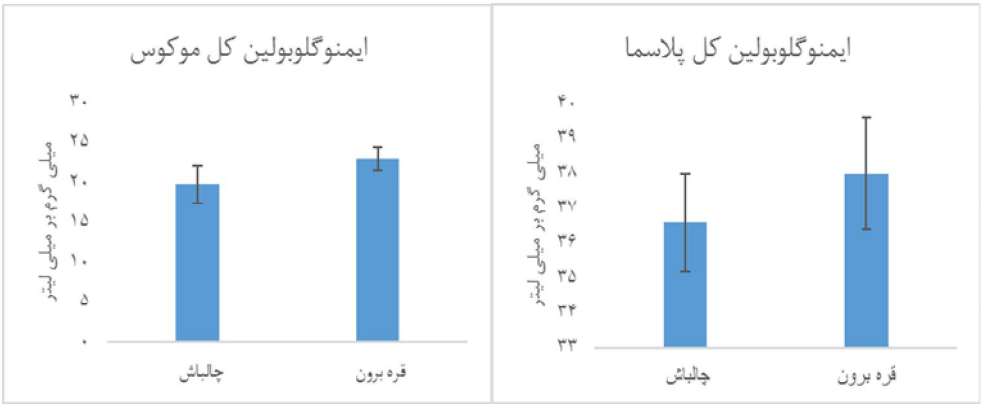
نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که در همه نمونه‌هایی که اندازه‌گیری صورت گرفت پروتئین محلول موکوس و پلاسما در ماهی چالباش نسبت به قره برون بیشتر بود هر چند این اختلاف معنی‌دار نبود (۰/۰۵) (P<۰/۰۵).

شکل ۱- سطح پروتئین محلول موکوس و پلاسمای چالباش و قره برون.

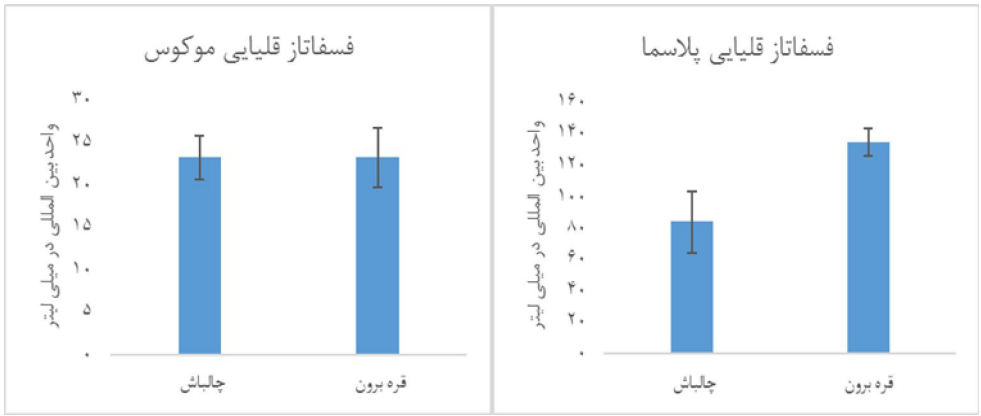
1- Minimum Inhibitory Concentration



شکل ۲- سطح آنزیم لیزوزیم موکوس و پلاسمای چالباش و قره برون.



شکل ۳- سطح ایمنوگلوبولین کل موکوس و پلاسما.



شکل ٤- سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی.

اختلاف معنی‌داری بین مقدار فعالیت لیزوزیم بین نمونه‌های موکوس چالباش و قره برون مشاهده شد (P<۰/۰۵) همچنین این اختلاف بین نمونه‌های پلاسمای این دو گونه نیز مشاهده شد، به‌طوری که میزان فعالیت لیزوزیم هم در نمونه‌های پلاسما و هم در نمونه‌های موکوس ماهی قره برون بیشتر از چالباش بود (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی در نمونه‌های پلاسما معنی‌دار بوده (P<۰/۰۵) و مقدار آن در ماهی قره برون بیشتر از چالباش می‌باشد در حالی‌که بین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی در نمونه‌های موکوس دوگونه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. مقدار ایمنو گلوبولین کل هم در موکوس و هم در پلاسمای ماهی قره برون نسبت به چالباش بیشتر است اما این اختلاف معنی‌داری بین مقدار ایمنوگلوبولین موکوس و پلاسمای دو گونه مشاهد نشد. گواردیولا و همکاران (۲۰۱٤) میزان لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز موکوس پوست و سرم را در ماهی طلایی (*sparus aurata*) اندازه‌گیری و مقایسه نمودند و به‌این نتیجه رسیدند که تفاوت معنی‌داری بین این دو آنزیم در موکوس و سرم وجود ندارد. فاست و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی موکوس قزل‌آلای رنگین‌کمان، آزاد ماهی اقیانوس اطلس و آزاد ماهی کوهو دریافتند که میزان فعالیت فسفاتاز قلیایی هر سه گونه در آب شور بالاتر از آب شیرین بود، در صورتی‌که میزان فعالیت لیزوزیم در آب شیرین بالاتر از آب شور بود. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم در آب شور، مربوط به قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی سه گونه در آب شور مشاهده نشد. ایگر و آبراهام (۱۹۹۰) افزایش وسیعی در میزان میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی سلول‌های موکوس و سنگفرشی اپیدرم کپور معمولی به دنبال زخم و جراحت مشاهده کردند. سنچولی (۲۰۱۲) برخی آنزیم‌های موکوس اپیدرم کپور معمولی را در وزن‌های ۲۰، ۵۰ و ۲۰۰ گرم بررسی نمودند. نتایج نشان داد که با افزایش وزن کپور معمولی فراوانی سلول‌های موکوسی، ضخامت اپیدرم و میزان پروتئین محلول موکوس و همچنین آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم نیز افزایش می‌یابد.

فعالیت آنتی‌باکتریال موکوس و پلاسما: در مطالعه حاضر هیچ‌گونه فعالیت ضد باکتریایی توسط موکوس و پلاسمای دو ماهی چالباش و قره برون ثبت نشد. این در حالی است که مطالعات زیادی بر روی فعالیت آنتی‌باکتریال موکوس ماهیان دیگر صورت گرفته است.

بر اساس چندین فاکتور نظیر گونه‌های ماهی، سطح سلامت، محیط زیست ماهی، محل موکوس و میکروبیوتای کلون شده در موکوس انوع مختلفی از فعل و انفعالات ممکن است به‌منظور جلوگیری از

عفونت پاتوژن‌ها دخیل شوند. ترکیبات مهار کننده معمولاً حساس به حرارت و پروتئینی‌اند و وزن مولکولی پایین تر از ۵ کیلو دالتون دارند. موکوس اپی تلیوم و دیگر موکوس‌های سطح بدن ماهی بخش‌هایی هستند که پپتیدهای آنتی‌باکتریایی فراوانی به‌طور ویژه در آن محتمل است. ترشحات سطحی موکوس ماهی مقادیر معینی از فاکتورهای کمپلمنت، لکتین، پروتئاز و لیزوزیم دارند که به خوبی شناسایی شده‌اند. گلیکوپروتئین‌های ضدباکتریایی ترشح شده از ماهی لای ماهی (*Tinca tinca*) و مارماهی (*Anguila anguila*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) قادر به کشتن باکتری از طریق ایجاد منافذ بزرگ (چندصد تا هزاران) در غشای باکتری هدف می‌باشند (ابران و همکاران، ۱۹۹۹). از بین سه آنزیم لیزوزیم، ترپسین و فسفاتاز قلیایی، بالاترین میزان فعالیت آنزیمی در ماهیان آکواریومی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*)، گربه‌ماهی (*Clarias batrachus*)، پنگوسی گوشت‌خوار (*Pangasius sanitwongse*) و ماهی قرمز (*Carassius auratus*) مربوط به پلی پپتید لیزوزیم می‌باشد. بر این اساس لیزوزیم در سیستم دفاع غیراختصاصی این ماهی‌ها نقش اصلی را ایفا می‌کند (حاجی‌مرادلو و همکاران، ۲۰۱۲).

به هر حال آزمایش‌های بیشتری جهت روشن شدن هر چه بیشتر فعالیت آنتی‌باکتریال موکوس این دو ماهی لازم است. هدف از انجام این پروژه تعیین تفاوت بین برخی از پارامترهای ایمنی. بین دوگونه که شباهت ظاهری بسیاری نسبت به هم دارند بود که این تفاوت‌ها به خوبی در برخی پارامترها مشاهده شد. به‌طور کلی این مطالعه تفاوت بین میزان فعالیت لیزوزیم در موکوس و پلاسمای و آلکالین فسفاتاز در پلاسمای دو گونه را نشان می‌دهد. همچنین تفاوتی در دیگر پارامترهای اندازه‌گیری شده مشاهده نشد.

سپاسگزاری

از مسئول آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی آبزیان و مسئول آزمایشگاه فرآوری آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مهندس سید رضا خالقی و مهندس اصغر نعیمی به سبب همکاری در اجرای هر چه بهتر این پروژه صمیمانه قدردانی می‌کنیم.

منابع

Chebanov, M.S., Galich, Chebanov, E.V., Galich, Sturgeon hatchery manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. 558, Ankara, FAO, 2013.

Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Saglio, P., Lemaître, C., and Molle, G. 1999. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 122(2): 181-189.

Ellis, A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology. 25: 827-839.

Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., and Ross, N.W. 2002. Skin morphology and humoral non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comp. Biochemical. Physiology. A 132: 645-657.

Guardiola, F.A., Dioguardi, M., Parisi, M.G., Trapani, M.R., Meseguer, J., Cuesta, A., and Esteban, M.A. 2015. Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defenses present on skin mucus of gilthead seabream (Sparus aurata), Fish and shellfish immunology, 45: 112-123.

Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., and Abolfathi, M. 2014. Camparatie study on skin mucus enzyme activity (lysozyme, trypsin, alkaline phosphatase) in four aquarium spices. Gorgan University of agriculture sciences and natural resources. 50p.

Harris, J.E., Harris and Hunt, S., Hunt, "The fine structure of iridophores inthe skin of the Atlantic salmon (Salmo salar L.)," Tissue and Cell, 5(3): 479–488, 1973.

Hellio, C., Pons, A.M., Beaupoil, C., Bourgougnon, N., and Gal, Y.L. 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. International journal of antimicrobial agents. 20: 214-219.

Hordvik, I., Thevarajan, I., Thevarajan, J., Samdal, I., Samdal, Bastani, N., Bastani, and B., Krossøy. 1999. "Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene," Scandinavian Journal of Immunology, 50(2): 202–210.

Iger, Y., and Abraham, M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp, Fish Biology. 36: 421–437.

Ingram, G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection–a review. Fish Biology, 16: 23-60.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol Chem, 193(1): 265-275.

Pigman, W., Pigman, "Mucus glycoprotein," in The Glycoconjugates, Horowitz, M.I., Horowitz and Pigman, W., Pigman, Eds., 1: 131–137, Academic Press, New York, NY, USA, 1977.

Ross, N.W., Firth, Ross, K.J., Firth, Wang, A., Burka, Wang, J.F., Burka, and Johnson, S.C., Johnson. 2000. "Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon Salmo salar skin mucus due to infection with the salmon louse Lepeophtheirus salmonis and cortisol implantation," Diseases o Aquatic Organisms, vol. 41(1): 1, 43–51.

Safari, R., Hajimoradloo, A., Jafarnodeh, A., Mohammadian, S., Neghadmoghaddam, Sh. 2016. Collection of aquatic bacteria produced with genetic confirmation (the first phase, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri*). Research projects, Gorgan University of agriculture sciences and natural resources. 42p.

Sancholi, O. 2012. Assessment of antibacterial properties of skin mucus of skin mucus in deferent weight of common crap (*Cyprinus carpio*). Master of sciences thesis, Gorgan University of agriculture sciences and natural resources. 74p.

Shepherd, K.L. 1994. Functions for fish mucus. Reviews in fish biology and fisheries. 4: 401-429.

Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. Biochimica et biophysica acta, 8: 302-309.

Siwicki, A.K., and Anderson, D.P. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn, Poland. 1993: 105-12.

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 Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148(3): 256-263.

Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, Sh., Okamoto, M., and Suetake, H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. Comprative Biochemistry and Physiology Part B 136: 723-730.

Tabak, L.A. 1995. In defense of the oral cavity: structure biosynthesis and function of salivary mucins. Annual Review Physiology. 57: 547-564.

Yano, T. 1996. The non-specific immune system: humoral defense. In: The fish Immune system: Organism, Pathogen and Environment. Iwama, G., and Nakanishi, T. (Eds). Academic press, San Diego, Pp: 105-157.