

# Presencia de actividad antimicrobiana en el mucus del pez chame *Dormitator latifrons*.

Mario Del Rosario<sup>1</sup>, Helena De la Torre<sup>1</sup>, Daniel Reyes<sup>1</sup> y Marcelo Muñoz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas Oceánicas y Recursos Naturales

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral

Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador

[mdel@espol.edu.ec](mailto:mdel@espol.edu.ec), [hemade@espol.edu.ec](mailto:hemade@espol.edu.ec), [wdreyes@espol.edu.ec](mailto:wdreyes@espol.edu.ec) y [mmunoz@espol.edu.ec](mailto:mmunoz@espol.edu.ec)

## Resumen

El presente trabajo describe la presencia de actividad antimicrobiana del mucus del pez chame (*Dormitator latifrons*) sobre diferentes bacterias de tipo Gram (+) y Gram (-). En esta forma, se demostró un efecto inhibitorio del mucus de chame sobre 2 de 3 cepas de tipo bacilo analizadas. Además, se determinó la existencia de un fuerte efecto inhibitorio del mucus de chame sobre cepas de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio harveyi*. También se observó, aunque en menor magnitud efecto inhibitorio sobre una cepa de *Vibrio anguillarum*. La información preliminar obtenida en este estudio sugiere la presencia de agentes antibacterianos en el mucus del pez chame, los cuales podrían ser utilizados en un futuro con una aplicación en salud animal y humana.

**Palabras claves:** chame, *Dormitator latifrons*, péptidos antimicrobianos, halos de inhibición

## Abstract

The present work describes the presence of antimicrobial activity in the mucus of the chame fish (*Dormitator latifrons*) against different Gram (+) and Gram (-) bacteria. In this way, an inhibitory effect of the chame mucus against 2 of 3 bacillus strains was seen. A strong inhibitory effect of the chame mucus was seen against *Vibrio vulnificus* and *Vibrio harveyi*. We also observed, although in less degree the inhibitory effect of the chame mucus against the *Vibrio anguillarum* bacteria. The preliminary information obtained in this study suggest the presence of antimicrobial agents in the chame fish mucus, which could be used in the future with application in animal and human health.

**Keywords:** chame, *Dormitator latifrons*, antimicrobial peptides, inhibition halos.

## Introducción

El chame (*Dormitator latifrons*), perteneciente a la familia Eleotridae es de amplia distribución a lo largo de la costa del Pacífico de nuestra América, que comprende desde el sur de California hasta el norte del Perú (Departamento de Lambayeque). En nuestro país se lo encuentra en: el estuario de San Lorenzo y delta del río Esmeraldas, delta del río Chone, río Portoviejo, delta del río Guayas y estuario de Santa Rosa. Este pez dado a las bondades que presenta para los cultivos acuícola, es producido de una manera artesanal en especial en la provincia de Manabí en las tradicionales cámaras [1]. El presente trabajo aborda un tema suscripta al aspecto microbiológico relacionado con la acción con las células mucosas glandulares que presentan una forma de recipiente de cuello delgado que se extiende hasta dentro de la dermis del animal y

se encuentra ampliamente distribuida entre las células planas de la epidermis del chame. Estas células secretan mucus, este producto glandular cumple múltiples funciones que son: permite al animal un mejor desplazamiento en su medio, con la mucosidad puede ser que tenga la misión de expulsar microorganismo, sustancias irritantes, el olor característico del chame esta contenido en el mucus. Así, el mucus complementaría una acción inter-específica de comunicación dentro de los cardúmenes de los peces [2].

En condiciones naturales de las ciénagas, hábitat preferido por estos peces, son espacios abiertos que no brinda una buena calidad de agua, con flora circundante abundante, es propicia para la propagación de agentes patógenos peyorativos a estos nichos ecológicos y que el chame a través de una

hipersecreción de mucus sus células glandulares de mucus bloquearían la acción de virus y bacterias nocivas.

En otras especies de peces se ha determinado la presencia de actividad antimicrobiana en extractos de proteicos de mucus [3,4], además la actividad de ciertas enzimas como la L-amino oxidasa ácida con propiedades antibacterianas se ha puesto de manifiesto en *Sebastes schelegeli* [5]. Estos trabajos demuestran que el mucus de los peces puede funcionar como parte del sistema inmune innato de los peces. En donde, este sistema sería la primera barrera de defensa de estos peces, protegiéndolos en cierto modo de algunos microorganismos presentes en sus hábitat. En otros trabajos se ha demostrado la presencia de péptidos antimicrobianos presentes en el mucus y células epiteliales de diferentes especies de peces como las pleurocidins en el lenguado [6,7], oncorhycin en la trucha [8,9], Moronecidin en striped bass [10], Myxinidin en el hagfish [11] y Parasin en el catfish [12].

El presente trabajo intenta demostrar la presencia de actividad antibacteriana en el mucus secretado por las células epidermales del pez chame utilizando para este fin bacterias de tipo Gram (+) y Gram (-). El uso de ambos tipos de bacterias tiene el objetivo de demostrar que la actividad antibacteriana en el mucus del chame tiene un amplio espectro de acción.

## **Materiales y métodos.**

### **Material biológico.**

Los peces utilizados en este estudio fueron donados por una estación de engorde de chame ubicada en el Cantón Rocafuerte, Manabí. Las muestras de mucus de chame fueron colectadas luego de su obtención por masajeo de la epidermis de los peces usando guantes y depositadas en tubos de 1.5 ml. Los microorganismos de prueba para los ensayos de actividad antimicrobiana fueron cepas identificadas *Bacillus sp.*(1), *Bacillus sp.* (2), *Bacillus sp.* (3), *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio vulnificus*. Además, también fue utilizada la cepa *Escherichia coli* D31 donada por el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” (CENAIM) y el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA)

### **Ensayos de actividad antimicrobiana por halos de inhibición.**

Tubos conteniendo un volumen de 15-20 ml de Lennox agar fueron mantenidos en baño maría a 45°C, para evitar su solidificación. En cada uno de estos fueron inoculadas  $2 \times 10^6$  bacterias y se homogenizaron con la ayuda de un vortex, para inmediatamente ser

depositados en cajas de petri, asegurando de esta manera el crecimiento bacteriano en todo el volumen del medio. Una vez solidificado el agar, fueron realizadas 5 perforaciones de 0.6 cm de diámetro, con una pipeta Pasteur estéril. Fueron depositados en los hoyos de cada una de las cajas 30 µl de muestra (plasma) y 30 ul de una dilución de 1/10 de la muestra y una dilución 1/100 de la misma muestra. Los 2 pozos restantes consisten en un control de crecimiento bacteriano (adicionando en el hoyo solución salina estéril) y un control de inhibición del crecimiento de las bacterias compuesto por etilendiamino tetra-ácido-acético (EDTA) al 5%. Las cajas fueron incubadas por más 16 horas, tiempo necesario para la detección de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los pozos.

### **Ensayo turbidométrico:**

El protocolo para los ensayos turbidométricos fue el realizado por Tapia, 1997 [13] pero utilizando el tampón Hepes 0.1M a pH 7 para la disolución de los microorganismos como está descrito en Lijima et al, 2003 [14]. El ensayo fue llevado a cabo mediante la adición de la muestra, las bacterias y el medio de cultivo. En paralelo fueron llevados a cabo un control positivo, un control negativo y un control de efecto de inhibición utilizando EDTA al 1% y 5%. El control positivo fue llevado a cabo colocando las bacterias y el medio de cultivo. El control negativo incluyó una muestra de sobrenadante de lisado de las células circulantes y medio de cultivo. Los controles de inhibición fueron realizados utilizando una solución de EDTA (1 % ó 5 %) adicionando bacterias y medio de cultivo. Cada uno de los análisis de prueba y controles fueron realizados por triplicado. Los resultados son descritos a continuación para cada una de las cepas como los valores en bruto de la absorbancia para cada uno de los tratamientos menos el valor de absorbancia del control negativo. A fin de estimar la capacidad de inhibición de los distintos tratamientos los resultados son presentados también como porcentaje de inhibición, el valor del porcentaje de inhibición fue obtenido usando la formula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia de tratamiento} - \text{Control negativo})}{\text{Control positivo}} \times 100$$

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico fueron realizados mediante ANOVA de una sola vía y luego realizando una

comparación de medias con la prueba de Sheffé utilizando el programa Statistica.

## Resultados.

A fin de realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana por halo de inhibición y turbidométricos fue necesario establecer la equivalencia entre la absorbancia y el número de bacterias correspondientes por espectrofotometría. A partir de estos análisis, se estableció la correspondencia de un valor de absorbancia de 1 fue aproximadamente equivalente a una densidad de  $1.7 \times 10^8$  de células/ml de *Bacillus sp.* (1),  $1.1 \times 10^8$  de células/ml de *Bacillus sp.* (2),  $6.9 \times 10^8$  de células/ml de *Bacillus sp.* (3),  $1.9 \times 10^8$  de células/ml de *V. harveyi*,  $3.6 \times 10^9$  de células/ml de *V. alginolyticus* y  $2.8 \times 10^9$  de células/ml de *V. anguillarum*,  $7.2 \times 10^8$  de células/ml de *V. vulnificus* y  $1.16 \times 10^9$  de células/ml de *E. coli* (D31).

Establecida la relación espectrofotométrica y el número de bacterias por mililitro, se procedió a los análisis de actividad antibacteriana. Los resultados por halo de inhibición de mucus de chame utilizando como cepa de prueba la bacteria *E. coli* D31 demostraron la presencia actividad antibacteriana de la sustancia de prueba. Una vez demostrada esta actividad antibacteriana se procedió a realizar los ensayos por el método turbidométrico para cuantificar dicha actividad en las otras cepas de estudio.

Los análisis turbidométricos de actividad antibacteriana realizados sobre las cepas identificadas como *Bacillus sp1* en la muestra de mucus cruda o en la dilución 1/10 de mucus de chame presentaron valores de absorbancia de  $0.312 \pm 0.42$  y  $0.345 \pm 0.007$ . Estos valores no presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al valor obtenido del control de crecimiento de esta cepa  $0.379 \pm 0.50$ . Los ensayos turbidométricos con la cepas identificadas como *Bacillus sp (2)* tratadas con mucus de chame presentaron valores de absorbancia de  $0.503 \pm 0.028$ . Este valor fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los valores de absorbancia obtenidos con las cepas de *Bacillus sp (2)* tratadas con mucus de chame diluido 1/10 ( $0.869 \pm 0.245$ ) y el control de crecimiento de dicha cepa ( $0.958 \pm 0.193$ ). Por el contrario, el crecimiento de *Bacillus sp (3)* no demostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento con mucus de chame ( $0.277 \pm 0.038$ ), mucus diluido ( $0.272 \pm 0.012$ ) y el control de crecimiento sin tratamiento ( $0.272 \pm 0.015$ ). Un resumen de los resultados de estos análisis es presentado en la figura 1.

Adicionalmente, fueron determinados los porcentajes de inhibición para cada uno de los valores obtenidos

con las diferentes cepas de bacilos utilizadas en este trabajo son presentadas en la figura 2.

En lo que concierne a la presencia de actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram (-) se determinó esta actividad contra 4 diferentes tipos de cepas bacterianas del género vibrio. Así, el crecimiento medido como absorbancia de las bacterias identificadas como *V. alginolyticus* no presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control de crecimiento ( $0.255 \pm 0.013$ ), mucus de chame crudo ( $0.290 \pm 0.08$ ) y el mucus de chame diluido 1/10 ( $0.277 \pm 0.055$ ). Para los análisis antimicrobianos ejecutados con *V. anguillarum*, se determinó a nivel de absorbancia del tratamiento control de crecimiento ( $0.048 \pm 0.04$ ), este presentó diferencias significativas con respecto al valor obtenido al tratamiento muestra de chame ( $0.007 \pm 0.007$ ). Sin embargo, los valores de densidad óptica del crecimiento de *V. anguillarum* luego del tratamiento con el mucus de chame diluido 1/10 ( $0.055 \pm 0.12$ ) no presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento control de crecimiento. Los resultados de los valores de absorbancia del crecimiento de *V. vulnificus* sometidos a la presencia de mucus crudo ( $0.11 \pm 0.020$ ) y mucus diluido ( $0.065 \pm 0.013$ ) presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento control de crecimiento. También, se pudo demostrar diferencias significativas en las absorbancias obtenidas entre el tratamiento de bacterias de *V. vulnificus* tratadas con mucus de chame y muestras de mucus de chame diluidas 1/10. Del mismo modo, los valores de densidad óptica de crecimiento bacteriano usando la cepa identificada como *V. harveyi* tratadas con mucus de chame ( $0.021 \pm 0.031$ ) y mucus de chame diluido ( $0.022 \pm 0.019$ ) presentaron diferencias significativas ( $p < 0.005$ ) en relación a las absorbancias determinadas en el tratamiento control de crecimiento ( $0.182 \pm 0.012$ ). Además, no se determinó ninguna diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la absorbancia del crecimiento de las bacterias identificadas como *V. harveyi* tratadas con mucus de chame y mucus de chame diluido 1/10 entre ellas. Un resumen de los resultados determinados sobre la actividad antibacteriana del mucus del chame en algunas cepas del género vibrio son presentados en la figura 3.

Los valores de porcentaje de inhibición encontrados para cada una de las cepas del genero vibrio utilizados en este estudio son presentados en la figura 4.

## Discusión.

A fin de establecer las condiciones ideales para la realización de los ensayos antibacterianos se estableció por espectrofotometría el número de células de acuerdo a la densidad óptica para las diferentes cepas utilizadas en este estudio. Los resultados de la cepa

control de este ensayo utilizando *E. coli* D31 presentan un valor  $1.16 \times 10^9$  el cual se aproxima al valor teórico esperado de  $1.2 \times 10^9$  (Tapia, 1997) lo cual valida los resultados obtenidos con las diferentes cepas usadas en este ensayo.

Los resultados obtenidos en los ensayos turbidométricos de actividad antibacteriana contra las cepas Gram (+) presentan un ligero efecto inhibitorio del mucus de chame sobre estas cepas. Sin embargo, no se podría determinar si existe un verdadero efecto inhibitorio sobre las cepas *Bacillus sp 1* y *Bacillus sp 3* con los bajos porcentajes de inhibición demostrados (17% y 10% respectivamente) no presentan valores significativamente diferentes a los valores del control de crecimiento. Esto podría encontrarse relacionado con la sensibilidad de la técnica, que probablemente no permitiría detectar una baja actividad antibacteriana o a la ausencia de efecto inhibitorio del mucus de chame sobre esas cepas. Por el contrario, el efecto inhibitorio demostrado sobre la cepa Gram (+) *Bacillus sp (2)* por el mucus de chame de 46%, cuyos valores son significativamente distintos del control de crecimiento demuestran la existencia de una verdadera inhibición. Así, podemos inferir que el mucus de chame tiene efecto inhibitorio sobre algunas cepas de bacterias Gram (+) de tipo *Bacillus*.

En lo que concierne a las cepas Gram (-) de vibrios utilizados en los ensayos turbidométricos podemos claramente determinar un fuerte efecto inhibitorio del mucus del chame sobre el crecimiento de *V. harveyi* y *V. vulnificus* cercano al 100% de inhibición. Esta actividad observada fue importante sobre estas cepas incluso cuando se utilizó el mucus de chame diluido 1/10 para los ensayos. Además, también se detectó una actividad antibacteriana importante sobre *V. anguillarum* 83%, aunque este efecto se pierde cuando el mucus es diluido 1/10. Finalmente nunca se detectó actividad antibacteriana del mucus de chame sobre la cepa de *V. alginolyticus*.

La presencia de actividades antibacterianas del mucus del pez chame sobre diferentes bacterias de tipo Gram (+) y Gram (-), implica que el efecto inhibitorio es de amplio espectro. En estos instantes, es muy difícil determinar el origen de esta actividad antibacteriana encontrada en las secreciones dérmicas de pez chame. Esta podría tener diferentes orígenes, uno de ellos puede estar vinculado con la presencia de péptidos antibacterianos que pueden estar presentes en las secreciones dérmicas como ha sido demostrada la presencia en otros peces tanto de agua dulce o marina. Sin embargo, no podemos descartar que dicha actividad se deba a la presencia de algún tipo de enzima u otro componente de diferente naturaleza química que sea responsable dicha actividad. Desde otro punto de vista, debemos también analizar que la acción antibacteriana puesta en evidencia en el mucus

de chame no solo tenga su origen en un solo compuesto y sea el producto de un sinergismo entre diferentes componentes.

Desde el punto de vista fisiológico, el presente trabajo da indicios sobre la resistencia de este pez para desarrollarse en lugares inhóspitos, así la secreción de determinados componentes en el mucus del chame puede conferirle algún tipo de inmunidad innata. Esta inmunidad, por lo demostrado en este trabajo funcionaría en forma selectiva, basados en el hecho, que algunas cepas no fueron inhibidas bajo exposición con mucus de chame. Este particular, nos indica algún tipo de adaptación fisiológica a determinados ambientes para conferir cierta resistencia a estos animales, hecho que le permite defenderse en forma selectiva contra cierto tipo de cepas bacterianas. Así, podríamos mantener la hipótesis, que cualquiera sea el origen de la actividad antibacteriana puesta en evidencia, sería el resultado evolutivo de este pez a los ambientes en los cuales ellos habitan.

El presente trabajo es a nuestro conocimiento el primer intento de establecer la presencia de actividad antibacteriana en un pez del litoral ecuatoriano. A su vez, presenta la originalidad de la especie, que por sus condiciones de vida en un hábitat extremo representa un buen candidato para la búsqueda de moléculas con propiedades antibacterianas y probablemente originales a nivel de estructura.

## Conclusiones.

El presente trabajo determinó la presencia de actividad antimicrobiana del mucus del pez chame contra bacterias Gram (+) y Gram (-). Así, se pudo determinar efecto inhibitorio del mucus del chame sobre las cepas codificadas como *Bacillus sp2*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *Vibrio harveyi*. Este estudio abre nuevas perspectivas y sienta las bases para el desarrollo de este tópico, tanto para definir el origen de esta actividad antibacteriana como para determinar su efecto en la respuesta inmune innata del pez chame.

## Bibliografía.

- [1] Bonifaz N, Campos M, Castelo R. El chame: una nueva fuente de alimentación e ingresos. Fundación Ciencia para el Estudio del Hombre y la Naturaleza, 1985 - 173 páginas
- [2] Lagler, K.F., J.E. Bardach and R.R. Miller. 1977. Ichthyology. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 506.
- [3] Subramanian S, Ross NW, MacKinnon SL. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. Comp

- Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2008 May;150(1):85-92.
- [4] Kuppulakshmi C, Prakash M, Gunasekaran G, Manimegalai G, Sarojini S. Antibacterial properties of fish mucus from *Channa punctatus* and *Cirrhinus mrigala*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2008 May-Jun;12(3):149-53.
- [5] Kitami Y, Tsukamoto C, Zhang G, Nagai H, Ishida M, Ishizaki S, Shimakura K, Shiomi K, Nagashima Y. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. *FEBS J*. 2007 Jan;274(1):125-36.
- [6] Cole AM, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):12008-13.
- [7] Douglas SE, Patrzykat A, Pytyck J, Gallant JW. Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Eur J Biochem*. 2003 Sep;270(18):3720-30.
- [8] Fernandes JM, Molle G, Kemp GD, Smith VJ. Isolation and characterisation of oncorhynchin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*. 2004 Feb;28(2):127-38.
- [9] Fernandes JM, Saint N, Kemp GD, Smith VJ. Oncorhynchin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem J*. 2003 Jul 15;373(Pt 2):621-8.
- [10] Lauth X, Shike H, Burns JC, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Nizet V, Taylor SW, Shimizu C, Bulet P. Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):5030-9.
- [11] Subramanian S, Ross NW, MacKinnon SL. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Mar Biotechnol* (NY). 2009 Nov-Dec;11(6):748-57.
- [12] Park IY, Park CB, Kim MS, Kim SC. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett*. 1998 Oct 23;437(3):258-62.
- [13] Tapia F. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor. Escuela Superior Politécnica del litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 1997.
- [14] Lijima N., Tanimoto N., Emoto Y., Morita Y., Uematsu K., Murakami T., Nakai T. Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophryx major*. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2003, pp. 675-686.

### **Agradecimientos.**

Los autores agradecen al CENAIM por la donación de algunas cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. Los autores desean agradecer particularmente al CSA y a su personal por prestar sus instalaciones para la realización de este trabajo y la donación de cepas para este estudio. El presente estudio fue cofinanciado como proyecto semilla por el Centro de Investigación Científica y Tecnológica (CICYT) de ESPOL y la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias Biológicas Oceánicas y Recursos Naturales. Los autores desean agradecer también, a Moisés Tacle Galárraga por su soporte a la investigación en la ESPOL y en particular a este proyecto.