



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN EN  
BIOTECNOLOGÍA SANITARIA DE ELCHE**

# **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

David Lorenzo Fuentes de la Fuente

Curso 2020-2021

**Determinación de la actividad antibacteriana de  
extractos orgánicos de moco epidérmico de peces**

**Tutores:**

**Dr. Juan Alberto Falcó Graciá**

**Dña. Rocío Díaz Puertas**

**Departamento de Farmacología, Pediatría y Química orgánica**

**D. Juan Alberto Falcó Graciá**, Investigador Senior del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), y

**Dña. Rocío Díaz Puertas**, doctoranda del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH)

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo que lleva por título “**Determinación de la actividad antibacteriana de extractos orgánicos de moco epidérmico de peces**”, presentado por **David Lorenzo Fuentes de la Fuente**, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández (UMH).

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el presente certificado a continuación.

## **RESUMEN**

Las enfermedades infecciosas producidas por bacterias han supuesto uno de los problemas sanitarios más importantes de la década. Con el desarrollo bacteriano de la resistencia a antibióticos, las herramientas para tratar estas enfermedades son escasas. Por ello, se apuesta por el uso de extractos naturales para su tratamiento. Los peces resultan ser de gran interés para la búsqueda de estos extractos, debido a la gran cantidad de especies que existen, la carga microbiana de los ecosistemas marinos y la funcionalidad de su sistema inmune innato. Asimismo, son estas primeras barreras del sistema inmune (piel y mucosa epitelial) las que son conocidas por facilitar la supervivencia de los peces debido a su multifuncionalidad antimicrobiana y su composición rica en diferentes péptidos y compuestos con potencial antimicrobiano, antivírico y antifúngico. En este trabajo, estudiaremos el potencial antibacteriano de los extractos de moco epidérmico de *Anguilla anguilla* y *Oncorhynchus mykiss*, así como su purificación mediante extracciones orgánicas y ensayos antimicrobianos frente a cepas bacterianas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## **ABSTRACT**

*Infectious diseases caused by bacteria have been one of the most important health problems of the decade. With the bacterial development of antibiotic resistance, the tools to treat these diseases are scarce. Therefore, scientists are committed to the use of natural extracts for its treatment. Fish turn out to be of great interest in the search for these extracts, due to the large number of species that exist, the microbial load of marine ecosystems and the functionality of their innate immune system. Likewise, these first barriers of the immune system (skin and epithelial mucosa) are those that are known to facilitate fish survival due to their antimicrobial multifunctionality and their composition in different peptides and compounds with antimicrobial, antiviral and antifungal potential. In this work, we will study the antibacterial potential of the epidermal mucus extracts of *Anguilla anguilla* and *Oncorhynchus mykiss*, as well as their purification through organic extractions and antimicrobial tests against bacterial strains such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antibióticos y su problemática .....	1
1.2 Resistencia a antibióticos .....	2
1.3 Nuevas fuentes naturales de antibióticos .....	3
1.4 Ventajas de los peces para la búsqueda de nuevos antibióticos .....	4
1.5 Secreciones de los peces como fuente de compuestos antimicrobianos.....	5
1.6 Actividad antibacteriana de la mucosa epitelial de los peces .....	5
1.6.1 Péptidos antimicrobianos.....	5
1.6.2 Enzimas .....	7
1.6.3 Otros componentes.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>11</b>
3.1 Extracción del moco de pez .....	11
3.1.1 Anguila .....	11
3.1.2 Trucha .....	12
3.2 Extracción orgánica.....	14
3.3 Ensayo de difusión en agar .....	15
3.4 Ensayo de dilución seriada en caldo de cultivo .....	16
3.4.1 Actividad del moco de pez junto a antibióticos .....	16
3.4.1.1 Kanamicina .....	17
3.4.1.2 Ampicilina.....	18
3.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos .....	18
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de moco de anguila.....	19
4.1.1 Extracción con diclorometano .....	19

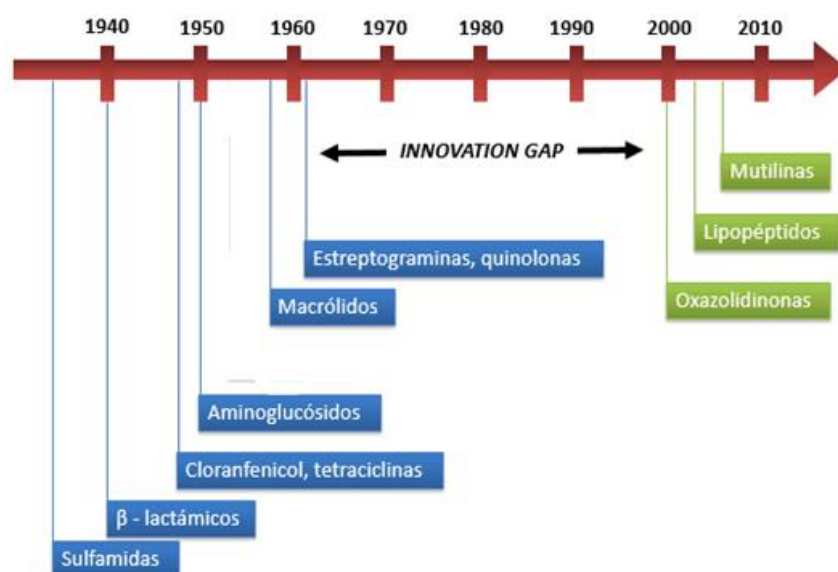
4.1.2 Extracción con dietiléter .....	20
4.1.3 Extracción con acetato de etilo.....	21
4.2 Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de moco de trucha .....	23
4.3 Ensayo de difusión en agar .....	24
4.4 Ensayo de dilución seriada en caldo de cultivo .....	26
4.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos .....	26
4.4.2 Actividad de los antibióticos junto al moco de anguila.....	26
4.4.2.1 Kanamicina .....	26
4.4.2.2 Ampicilina.....	27
4.4.3 Actividad de los antibióticos junto al moco de trucha .....	28
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>7. PROYECCIÓN DE FUTURO .....</b>	<b>33</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antibióticos y su problemática

Las enfermedades infecciosas, causadas por agentes como bacterias, supusieron una de las principales causas de muertes en la década de 1990 (1). Las bacterias fueron causantes de numerosas epidemias devastadoras en cuanto a letalidad; tales como la conocida plaga Justiniana, causada por la bacteria *Yersina pestis* y que se cobró 100 millones de muertes en todo el mundo (2), o la epidemia de neumonía causada por *Mycoplasma pneumoniae* durante el período comprendido entre 2006 y 2012 (3), las enfermedades bacterianas siguen contando con una gran prevalencia en la actualidad.

Como principal estrategia farmacológica para el tratamiento de estas enfermedades bacterianas, los antibióticos tomaron un papel fundamental desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 (4). Sin embargo, tras una época muy fructífera en el desarrollo de estos fármacos (1930-1960), en la que se describieron 8 familias moleculares de estos compuestos (sulfamidas,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, estreptograminas y quinolonas) (Fig. 1) (5), la producción de antibióticos experimentó un decaimiento significativo. A esta época se le denominó *innovation gap* (en español, brecha de innovación), y, durante este tiempo, los nuevos antibióticos surgían de la modificación y mejora de las estructuras químicas existentes. No obstante, estas mejoras solo mostraron eficacia adecuada a corto plazo (6).



**Fig. 1. Diagrama temporal del descubrimiento de nuevas familias de antibióticos.** En esta imagen podemos observar un diagrama temporal en el que se indican en color azul las familias de antibióticos descubiertos antes del 1962, y en rojo las tres familias estructurales (oxizolidinonas, lipopéptidos y mutilinas) descubiertas tras la brecha de innovación experimentada entre la época de 1962 y los 2000, en la que no se introdujeron nuevas estructuras importantes. NOTA: aunque el primer antibiótico descubierto fue la penicilina, se consideran las sulfamidas la primera familia estructural conocida ya que fueron los primeros fármacos eficaces como antimicrobianos y pavimentaron el camino para la revolución de los antibióticos en la medicina humana (7).

## 1.2 Resistencia a antibióticos

La carencia de nuevas fórmulas y estructuras para los antibióticos, junto con el uso indebido y masivo de los existentes, concluyó en la aparición de resistencia bacteriana frente a la mayoría de estos (8).

Esta condición de resistencia, que impide el uso efectivo de los agentes antimicrobianos, puede ser intrínseca, adaptativa o adquirida. La resistencia intrínseca permite a la bacteria resistir el tratamiento antibacteriano debido a características funcionales o estructurales inherentes del mismo, mientras que la resistencia adquirida indica la capacidad de las bacterias para adaptarse mediante un rápido alertamiento de sus transcriptomas en respuesta a un ambiente estresante (9).

Dependiendo de la especie de bacteria y al antibiótico al que es resistente, existen tres clases de resistencias principales. En la Tabla 1 se indica cada tipo de resistencia, así como las bacterias resistentes y los antibióticos frente a los que se presenta esta condición.

**Tabla 1.** Resumen de tipos de resistencia a antibióticos.

Clases de resistencia	Antibiótico	Microorganismo resistente	Referencia
Primera	Meticilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	(10)
	Vancomicina		
Segunda	Penicilinas	<i>Acinetobacter baumannii</i>	(11)
	Cefalosporinas	<i>Escherichia coli</i>	
	Carbapenémicos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Monobactámicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Quinolonas		
	Aminoglucósidos		
	Tetraciclinas		
Tercera	Polimixinas		(12)
	Penicilinas	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
	Cefalosporinas	<i>Escherichia coli</i>	
	Carbapenémicos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Monobactámicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

La resistencia a antibióticos se ha convertido en los últimos años en una de las mayores preocupaciones sanitarias a nivel global. Ha supuesto una exponencial aparición de enfermedades infecciosas con costosos tratamientos, además de las alrededor de 700.000 muertes anuales atribuidas a este fenómeno (13). Para intentar combatir este creciente problema, se abogó por la modificación química de las estructuras de los antibióticos existentes; sin embargo, esta estrategia únicamente fue fructífera a corto plazo, ya que, pasado un tiempo de su uso en bacterias resistentes, la efectividad se veía mermada por mecanismos bacterianos(14).

### **1.3 Nuevas fuentes naturales de antibióticos**

En vista del creciente problema que supone la carencia de nuevos antibióticos para la salud mundial causada por la aparición de bacterias resistentes, las investigaciones sobre la búsqueda de nuevas estructuras químicas para la creación de fármacos novedosos se han acrecentado. Para ello, los investigadores apuestan por el estudio del uso de extractos naturales con actividades antimicrobianas para tratar enfermedades causadas por estas (15). Los avances tecnológicos junto con el desarrollo de nuevas técnicas de caracterización y búsqueda, como el procedimiento QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), han permitido establecer relaciones entre la estructura y la actividad de extractos naturales para, así, poder predecir el efecto biológico y antimicrobiano que puedan presentar(16).

Entre estos compuestos naturales, se ha observado un auge en el interés por los denominados péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés *antimicrobial peptides*). Estas moléculas juegan un papel muy importante en la respuesta inmunológica innata humoral de los seres vivos (17). Los AMPs son péptidos cortos de bajo peso molecular con carga positiva (ricos en los aminoácidos Lys y Arg), lo que les permite penetrar fácilmente a través de las paredes y membranas bacterianas (18). Además, estos compuestos muestran actividad de amplio espectro, destrucción rápida y alta selectividad tanto contra especies Grampositivas como especies Gramnegativas (19).



Además de los péptidos antimicrobianos, existen otros compuestos de gran interés farmacológico que podemos encontrar en extractos naturales: las enzimas. Se ha estudiado la existencia de organismos que secretan estas proteínas con actividad antibacteriana como herramienta de defensa contra patógenos, entre ellas las proteasas, lisozimas y las lectinas (20). Las proteasas son un tipo de enzimas cuya actividad es la hidrólisis de enlaces peptídicos, capaces por tanto de la destrucción de moléculas proteicas esenciales en las estructuras de estos patógenos (21). Las lisozimas son enzimas cuya función principal es la de hidrolizar enlaces que componen el peptidoglucano de la pared celular bacteriana, lo cual conlleva a la lisis celular de dichos patógenos en un ambiente hipotónico (22). Las lectinas, por otro lado, tienen una función de reconocimiento de patrones de moléculas en las estructuras externas de patógenos bacterianos, fomentando la destrucción de dichas células (23).

Este tipo de hallazgos vislumbran un gran abanico de posibilidades de obtener productos farmacológicamente activos y con actividad antibacteriana. Por tanto, cabe suponer que la búsqueda de estos compuestos en especies cuyos ecosistemas sean hostiles puede ser de gran interés.

#### **1.4 Ventajas de los peces para la búsqueda de nuevos antibióticos**

El estudio del mar como fuente de productos antimicrobianos lleva en auge desde comienzo de los años 70 (24). Por consiguiente, cada vez se aboga más por la obtención de productos farmacológicos procedentes de los ecosistemas marinos, más concretamente derivados de los peces.

Una de las causas de este hecho es la ingente cantidad de biomasa que podemos encontrar en el mar, el cual cuenta con un número aproximado de  $10^{29}$  células, siendo aproximadamente el 90% de las mismas de origen microbiano según el Censo de Vida Marina (25). Por otro lado, los peces teleósteos presentan una gran riqueza y diversidad de especies como consecuencia de la heterogeneidad de los distintos ecosistemas acuáticos (26), llegándose a datar de más de 27 000 especies (27). Además, los peces constatan el primer grupo de organismos que presentan un sistema de inmunidad adaptativo; sin embargo, debido a la ineficiente respuesta que este les brinda, delegan la mayoría de sus funciones defensiva ante patógenos en su sistema inmune innato (28).

Debido a este hecho, cabe esperar que, en la piel y mucosas epiteliales excretadas por los peces, lo que constituye la primera barrera física del sistema inmune de estos organismos,

existan diversas moléculas capaces de eliminar patógenos bacterianos y, por tanto, nos proporcione una nueva fuente de compuestos con potencial farmacológico.

### **1.5 Secreciones de los peces como fuente de compuestos antimicrobianos**

Tal y como ha sido expuesto en el apartado anterior, los peces, así como muchos otros organismos que viven en ecosistemas acuáticos, secretan una capa de moco epidérmico en su piel que actúa como interfaz biológica entre ellos y el ambiente, siendo la primera barrera defensiva con la que cuentan contra organismos patógenos y no patógenos (29). Este moco es secretado por unas células llamadas *goblet cells* o células calciformes secretoras de mucosa (30) y, además de función defensiva, tiene función de lubricación, protección mecánica, participa en la regulación osmótica y facilita el movimiento en el agua (31).

La mucosa epitelial de los peces está compuesta mayoritariamente por glucoproteínas de alta intensidad (mucinas) y carbohidratos complejos, compuestos que otorgan al moco propiedades viscoelásticas y de protección respectivamente (32), (33).

Además, este moco es rico en diferentes ácidos grasos saturados monosaturados y poliinsaturados, los cuales otorgan una cierta función defensiva contra patógenos (34), y metabolitos secundarios de los propios organismos tales como el ácido azelaico, el ácido N-acetilneuramínico, la N-acetilglucosamina y el ácido hidroxiisocaproico, los cuales posiblemente confieran actividad antibacteriana (35).

Asimismo, el continuo estudio de las secreciones mucosas de los peces ha demostrado la presencia de diversas sustancias de carácter antimicrobiano en ellas. Por un lado, diversas investigaciones afirman la presencia de un amplio abanico de AMPs con actividad antibacteriana (36). Igualmente, se ha probado la composición del moco de pez en enzimas como proteasas, lisozimas o lectinas (30), e incluso se han caracterizado inmunoglobulinas, proteínas del complemento y otros componentes que juegan con un papel significativo en la defensa inmune innata de los peces (37) y que, por tanto, pueden resultar de gran interés.

### **1.6 Actividad antibacteriana de la mucosa epitelial de los peces**

#### **1.6.1 Péptidos antimicrobianos**

En la actualidad se han caracterizado gran cantidad de **AMPs** en las mucosas de la piel de los peces. Estos organismos son dependientes casi por completo de su sistema inmune

innato, por tanto, son fuentes naturales de estos compuestos que utilizan como herramientas de defensa contra patógenos. Además, se ha estudiado la expresión de todas las clases principales de AMPs en estos organismos, llegándose a caracterizar defensinas, catelicidinas, hepcidinas, péptidos derivados de histonas y piscidinas (38).

En la Tabla 2 podremos observar una clasificación de los diferentes tipos de AMPs que, hasta el momento, se han caracterizado en las mucosas epidérmicas de los peces. Los siguientes datos provienen una revisión bibliográfica de las características antibacterianas de secreciones epidérmicas de pez.

**Tabla 2.** Resumen de AMPs caracterizados de moco de pez.

AMP	Característica	Especie	Bacteria afectada	Referencia
<b>Parasina I</b>	Procedente de la histona H2A. Actividad contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas.	<i>Parasilurus asotus</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Cytophaga aquatilis</i> <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Edwardsiella ictalurid</i> <i>Lactococcus garvieae</i>	(39)
<b>Hipoposina</b>	Procedente de la histona H2A. Actividad contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas.	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> <i>Vibrio salmonicida</i> <i>Aeromonas salmonicida</i>	(39)
<b>SAMP H1</b>	Procedente de la histona H1. Actividad contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas.	<i>Salmo salar</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Vibrio anguillarum</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Listeria ivanovii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i>	(40)
<b>S30</b>	Derivado de una proteína ribosomal. Actividad antibacteriana.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listonella anguillarum</i> <i>Planococcus citreus</i>	(41)
<b>60S</b>	Derivado de una proteína ribosomal. Actividad antibacteriana.	<i>S. salar</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	(42)
<b>L40</b>	Derivado de una proteína ribosomal. Actividad antibacteriana.	<i>S. salar</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	(42)
<b>L36A</b>	Derivado de una proteína ribosomal. Actividad antibacteriana.	<i>S. salar</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	(42)
<b>L35</b>	Derivado de una proteína ribosomal. Actividad antibacteriana.	<i>S. salar</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	(42)

<b>Pleurodicina</b>	Péptido catiónico. Actividad antibacteriana por reconocimiento de patrones.	<i>Pleuronectes ferrugínea</i> ; <i>Hippoglossoides platessoides</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	(43)
<b>Moronecidina</b>	Destrucción bacteriana de amplio espectro.	<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i> (híbrido)	<i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus luteus</i>	(44)
<b>Paraxina</b>	Destrucción de células bacterianas por formación de poros.	<i>Pardachirus marmoratus</i>	Bacterias Grampositivas y Gramnegativas.	(44)
<b>Piscidinas (1-4)</b>	Destrucción de células bacterianas por actividad formadora de poros.	<i>Epinephelus bruneus</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	(39) (45)
<b>Hepcidina</b>	Disminuye la concentración disponible de hierro para las bacterias patógenas.	<i>Channa maculata</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(39) (41)
<b>Taquiquinina-1</b>	Produce sustancias altamente antimicrobianas como la sustancia P.	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella salmonicida</i>	(39) (46)
<b>Timosina-beta-12</b>	Elimina las bacterias del interior celular mediante una función mecánica.	<i>Lateolabrax japonicus</i> .	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella salmonicida</i>	(39) (43).
<b>Mixidina</b>	Actividad destructora de bacterias a muy bajas concentraciones.	<i>Myxine glutinosa</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella salmonicida</i>	(46)

### 1.6.2 Enzimas

Además de los péptidos antimicrobianos, se ha demostrado la presencia de diversas enzimas que otorgan a los peces capacidad defensiva ante patógenos.

Por un lado, encontramos las **proteasas**, las cuales cuentan actividad proteolítica y proporcionan al huésped la capacidad de destruir componentes proteicos vitales de los organismos patógenos que puedan suponer una amenaza (21). En la Tabla 3 podemos observar un resumen de los tipos de proteasas que se han caracterizado del moco de pez.

**Tabla 3.** Resumen de proteasas caracterizadas de moco de pez.

Proteasa	Función	Especie	Referencia
<b>Tripsina</b>	Función bacteriolítica frente a bacterias Gramnegativas patógenas de peces	<i>Salmo salar</i>	(47)
<b>Calepsina D</b>	Producción de un péptido antimicrobiano de gran eficacia de la histona H2A	<i>Silurus glanis</i>	(48)
<b>Aminopeptidasa</b>	Función bacteriolítica contra patógenos de peces	<i>Anguilla japonica</i> <i>Anguilla anguilla</i>	(48)
<b>Caspasas 1-6</b>	Inducción de pyroptosis en moléculas de liposacáridos de bacterias Gramnegativas	<i>Dicentrachus labrax</i>	(49)
<b>Proteasa tipo L</b>	Función bacteriolítica contra patógenos de peces. Gram negativos y Gram positivos.	<i>Anguilla japónica</i> <i>Anguilla anguilla</i>	(49)
<b>Catepsina B</b>			
<b>Catepsina L</b>			

Por otro lado, encontramos las **lectinas**. Estas enzimas reconocen patrones en células bacterianas u otros patógenos para la destrucción de los mismos mediante el reclutamiento del sistema del complemento o de las células fagocíticas (23). Por ello, juega un papel muy importante en la defensa innata de los peces. En la siguiente tabla podemos observar un resumen de las lectinas caracterizadas en las mucosas epiteliales de los peces.

**Tabla 4.** Resumen de lectinas caracterizadas de moco de pez.

Lectina	Especie	Bacterias afectadas	Referencia
<b>Lectina de unión a manosa dependiente de Ca<sup>2+</sup></b>	<i>Silurus asotus</i>	<i>Leishmania braziliensis</i> <i>Leishmania chagasi</i> <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Cryptosporidium sp.</i>	(50)
<b>Nattecina D</b>	<i>Salmo salar</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	(51)
<b>Lectina de unión a manosa</b>	<i>Gadus morhua</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(50)
<b>Lectina de unión a fructosa</b>	<i>Dicentrachus labrax</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> No efectiva frente Grampositivas.	(49).

Además de proteasas y lectinas, algunos organismos marinos cuentan en su repertorio de compuestos enzimáticos para la defensa contra organismos patógenos con las **lisozimas**. Estas enzimas son capaces de destruir células bacterianas y, por ello, juegan un importante papel como componente del sistema inmune innato de estos organismos (22).

La caracterización de estos compuestos en los peces se ha visto limitada a únicamente dos tipos de lisozimas, las de tipo c o *chicken-type lysozyme*, y las de tipo g o *goose-type lysozymes* (52). Se ha estudiado la presencia de ambos tipos de lisozimas en el moco epidérmico de *Ctenopharyngodon idella* (53). Igualmente, en la especies como *Oreochromis Aureus* (54) y *Scophthalmus maximus* (55) se ha observado la presencia de lisozima tipo c en la caracterización de sus respectivas mucosas.

### 1.6.3 Otros componentes

En las mucosas epidérmicas de los peces se han encontrado otros tipos de compuestos que también toman parte en la defensa contra patógenos bacterianos y que, debido a ello pueden resultar interesantes para la búsqueda de nuevas herramientas farmacológicas efectivas.

Por un lado, se han encontrado las proteínas C- reactivas o pentraxinas, las cuales son proteínas de unión a fosforilcolina (56) capaces de aglutinar y precipitar células bacterianas por medio de la unión a este fosfolípido que compone su estructura externa (57). Por otro lado, las proteínas del complemento del sistema inmune innato también han sido objeto de investigación debido su capacidad de provocar reacciones en las membranas bacterianas que derivan en su destrucción proteolítica (58). Igualmente, se han descubierto otro tipo de proteínas con capacidad bacteriolítica en diversas especies de peces. Cabe destacar, entre otras, la transferrina (59) y la fosfatasa alcalina (60). En la Tabla 5 podemos observar de manera resumida los diferentes componentes comentados anteriormente, las especies de peces de los cuales han sido caracterizados y las bacterias que se ven afectadas por su actividad.

**Tabla 5.** Resumen de otros compuestos caracterizadas de moco de pez.

Compuesto	Función	Especie	Bacterias afectadas	Referencia
<b>Pentraxinas</b>	Aglutinación y precipitación de células bacterianas por unión al fosfolípido fosforilcolina	<i>Salmo salar</i> , <i>Anarhichas lupus</i> <i>Gadus morhua</i> ,	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseriae spp</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	(56)

---

		<i>Hippoglossus.</i>		
		<i>hippoglossus</i>		
		<i>Catla catla</i>		
<b>C3</b>	Sistema del complemento. Destrucción proteolítica de membranas bacterianas	<i>Hippoglossus.</i> <i>Hippoglossus</i>	ND <sup>1</sup>	(61)
<b>C1q</b>	Sistema del complemento. Destrucción proteolítica de membranas bacterianas	<i>Acipenser baerii</i>	ND	(62)
<b>C7</b>	Sistema del complemento. Destrucción proteolítica de membranas bacterianas	<i>Ctenopharyngodon</i> <i>idella</i>	ND	(63)
<b>Transferrina</b>	Quelación de hierro y privación de este para los patógenos bacterianos	<i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Sparus aurata</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	(64) (65)(61)
<b>Fosfatasa alcalina</b>	Destrucción hidrolítica de las membranas bacterianas	<i>Salmo salar</i> <i>Oncorhynchus kisutch</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Bacterias Grampositivas y Gram negatvas	(60).

---

1. ND, no determinado.

Gracias a todo el contenido bibliográfico disponible de investigaciones previas acerca del tema tratado, el potencial farmacológico del moco de pez se ve respaldado con claras evidencias. El objetivo de este proyecto es la caracterización del moco de especies de peces, estudio de sus componentes en cuanto a su actividad antibacteriana se refiere y el posterior fraccionamiento de estos para, así, avanzar en la investigación de su potencial antibacteriano.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es el análisis del potencial antibacteriano de las secreciones mucosas epidérmicas de los peces, mediante ensayos que permitan una mejor comprensión de su actividad y mecanismo de acción. Para llevar la correcta resolución de este objetivo principal, se llevaron a cabo varios objetivos específicos:

- Análisis bibliográfico de la composición en sustancias antimicrobianas de las mucosas y secreciones epiteliales de los peces, así como de su extracción, almacenamiento y procesamiento.
- Estudio de la actividad antibacteriana del moco de pez frente a diferentes bacterias.
- Estudio de la posible actividad sinérgica del moco de pez junto con antibióticos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Aislamiento del moco epitelial de los animales

El moco fue extraído directamente de los peces en el animalario de la Universidad Miguel Hernández por personal especializado en ello. Este proceso no fue realizado por el estudiante, quien procesó las muestras ya aisladas, pero se expone en este trabajo la tarea de aislamiento para la mejor comprensión del trabajo. Las muestras de trabajo fueron aisladas de anguila europea (*Anguilla anguilla*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como se expone a continuación

#### 3.1.1 Anguila

Para la extracción de moco se utilizaron ejemplares de anguila con un peso medio de 200g de la especie *Anguilla anguilla*. Antes de extraer el moco los peces fueron sometidos a un período de ayuno de 24 horas. Los peces fueron traspasados desde el tanque, donde se encontraban con las condiciones requeridas para su mantenimiento, a recipientes con agua para limpiarlos. Posteriormente, fueron introducidos en bolsas de polietileno de 20 x 30 cm con 5 mL de tampón fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de *phosphate buffered saline*). El tamaño de las bolsas y el volumen de PBS utilizado dependerá del tamaño de los peces. Estas bolsas se depositaron en un recipiente con hielo y agua durante media hora para inducir una condición de estrés hipotérmico que es un estímulo para la producción de moco epidérmico (69). Los peces

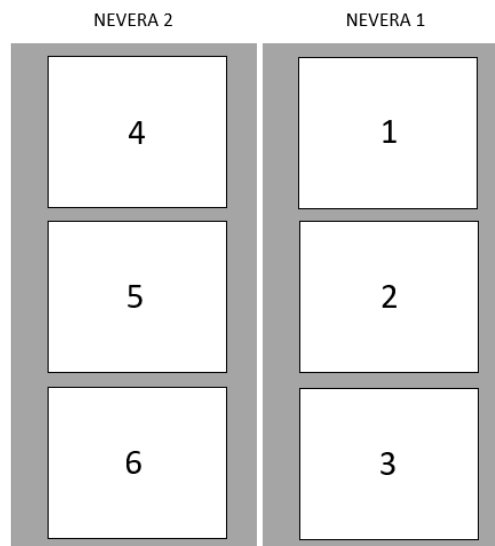


fueron devueltos a los tanques intentando arrastrar la mayor cantidad posible de moco de la piel.

### 3.1.2 Trucha

Las truchas se encontraban divididas en tres grupos diferentes: un grupo control y dos grupos que fueron sometidos a tratamientos de inmunestimulación. Este tratamiento consistió en la administración de compuestos que actúan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); lipopolisacárido (LPS), como patrón molecular asociado a bacterias y sal sódica del ácido policitídílico (Poly I:C), que imita las estructuras de ARN de doble cadena asociado a algunos virus.

Las truchas fueron divididas en 6 peceras almacenadas en dos cámaras frigoríficas a 14 °C. Estas cámaras contaban con una pecera de cada uno de los grupos de truchas (Control, LPS y Poly I:C) (Figura 2).



**Figura 2. Distribución de las peceras dentro de las cámaras frigoríficas (14°C).** Las cámaras están dispuestas de tal manera que la Nevera 2 está más próxima a la puerta de entrada a la sala. En cuanto a la disposición de los grupos de peces en cada nevera: en las peceras 1 y 4 se encuentra el grupo control (4 peces por pecera); en las peceras 2 y 5, los peces tratados con LPS (12 peces por pecera); en las peceras 3 y 6, los peces tratados con Poly I:C (12 peces por pecera).

El primer día (Día 0), las truchas fueron introducidas en un baño con triclaína metanosulfato (MS-222) a una concentración de 100 µg/ml. Este compuesto analgésico duerme a los peces para proceder con los tratamientos pertinentes. Cada ejemplar de trucha procedentes de las de las peceras 2, 5 y 3, 6 fue inyectado con 20 µl de LPS (1,5 µg/ml) y Poly I:C (2,5 µg/ml) respectivamente.

El segundo día (Día 1) se procedió con la recogida de las muestras. Después de 24 h de haber sido tratados, las truchas fueron extraídas de las respectivas peceras. De las peceras 1 y 4 (PBS, Control) se extrajeron 3 peces (1 grupo de 3 peces); de la pecera 2 (LPS), 6 peces (2 grupos de 3 peces); de la pecera 5 (LPS), 6 peces (2 grupos de 3 peces); de la pecera 3 (Poly I:C), 6 peces (2 grupos de 3 peces), y de la pecera 6 (Poly I:C), 6 peces (2 Grupos de 3 peces).

Tras la extracción de los peces, estos fueron sacrificados con una solución más concentrada de MS-222 (300 µg/mL) y fueron añadidos a bolsas con 3 mL de PBS (3 peces/bolsa). Las bolsas se mantuvieron en hielo y se llevaron al laboratorio para el procedimiento de la extracción de moco. Además, se extrajeron muestras de epidermis.

El tercer día (Día 2) se procedió con la recogida de las muestras. Después de 72h de haber sido tratados (tras tres días de tratamiento), las truchas fueron extraídas de las respectivas peceras. De las peceras restantes se extrajeron 6 peces (2 grupos de 3 peces) y se prosiguió con el mismo procedimiento de recolecta y almacenamiento mencionado en el día 1.

En cuanto a la organización de los lotes de los extractos de moco de trucha, estos fueron clasificados por neveras, las cuales, a su vez, fueron separadas según el tratamiento al que fueron sometidos las truchas contenidas en ellas como ha sido explicado anteriormente. También fueron clasificados según el día en el que se realizó la extracción, es decir, según el tiempo que ha transcurrido desde el tratamiento. Por ejemplo, el lote LPS 3, que hace referencia al moco extraído de las truchas tratadas con LPS procedentes de la nevera 3, está dividido en LPS 3.1 y LPS 3.3, siendo los lotes extraídos en el día 1 y el día 3 respectivamente.

#### - **Procesamiento preliminar de los aislados mucosos**

Una vez extraído, el moco fue recolectado en tubos *falcon* de 15mL de volumen. Tras ello, se llevó a cabo un primer tratamiento al moco con la finalidad de purificarlo antes de realizar las extracciones y ensayos antibacterianos. El método utilizado se basa, con ciertas modificaciones, en los estudios de Gabriella *et al.* (2014) (66) y Balasubramanian *et al.* (2012) (67).

Primeramente, se realizó una primera centrifugación (3000 g, 20 min, 4 °C), obteniéndose un precipitado compuesto por restos celulares, bacterianos, escamas y todo tipo de deshechos que puedan haber quedado en el moco por el método de obtención (68);

una fase gelatinosa en la parte superior formada por glúcidos y lípidos componentes del moco (68), y un sobrenadante formado por compuestos proteicos de interés (68). Se descartó el precipitado y la fase gelatinosa y nos quedamos con el sobrenadante. Tras este paso, se sometió a la muestra a sonicación (Branson Sonifer®) durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C, para después proceder con una segunda centrifugación (centrífuga Allegra® X-15R Centrifuge) del sobrenadante (3000 g, 20 min, 4 °C). El sobrenadante resultante fue recolectado en alícuotas de 500 µL y 3000 µL, y almacenado a -80 °C para su posterior liofilización (liofilizador Telstar.LyoQuest™®).

### 3.2 Extracción orgánica

En este proyecto se ha probado la eficacia de la extracción y purificación del moco epidérmico de pez con el uso de disolventes orgánicos. Para ello, el protocolo se basa, con ciertas modificaciones, en el procedimiento de los estudios de Subramanian *et al.* (2008) (70), Rao *et al.* (2015) (71) y Lee *et al.* (2020) (72).

Primeramente, se resuspendieron el moco extraído y liofilizado en etanol 95 %, con el volumen necesario para alcanzar una concentración inicial de 1 mg/mL. Para ello, previamente se midió la concentración proteica en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®, Wilmington, MA, USA) del moco para, así, poder normalizarla al valor deseado (1 mg/mL). Se contó con diferentes lotes de moco, extraídos en días diferentes, los cuales contenían concentraciones de moco distintas.

Tras la resuspensión del liofilizado, se sometió a la mezcla a una centrifugación (17950g, 30 min, 4 °C). Tras este paso, se sustrajo el sobrenadante alcohólico y se reservó. El precipitado obtenido fue lavado una vez más con etanol 95 %, procediendo a una segunda centrifugación (17950g, 30 min, 4 °C). Tras esto, el sobrenadante resultante fue descartado y quedándose el precipitado.

Este precipitado fue resuspendido en diferentes disolventes orgánicos junto con agua destilada. En la bibliografía revisada anteriormente, se observó que el disolvente más utilizado fue el diclorometano (Sigma Aldrich®) (70), (71), (72); sin embargo, además otros dos disolventes orgánicos como el acetato de etilo (Sigma Aldrich®) y el dietiléter (Sigma Aldrich®) fueron probados; aunque en las muestras de moco de trucha únicamente se realizó la

extracción con diclorometano. Esta resuspensión fue realizada de diferentes formas: utilizando un volumen de disolvente orgánico cuatro veces mayor al de agua, tal y como se realiza en estudios anteriores (73), y utilizando disolvente orgánico y agua por partes iguales. Una vez resuspendido el precipitado, la mezcla resultante se divide en distintas fases: una fase orgánica, una interfase y una fase acuosa. En el caso del diclorometano la fase orgánica permanece en la parte superior, mientras que la acuosa en la parte inferior. Con los otros dos disolventes ocurre lo contrario. Una vez diferenciadas las fases en cada una de las alícuotas, estas fueron separadas y se procedió con los tratamientos correspondientes para cada una de ellas. Las fases orgánicas fueron secadas y concentradas con nitrógeno, así como las interfases y el etanol sobrenadante de los pasos primarios del protocolo; las fases acuosas, por otro lado, fueron liofilizadas o secadas con un sistema concentrador de vacío SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific®, Wilmington, MA, USA).

Tras concentrar las muestras, estas fueron resuspendidas de nuevo en diferentes disolventes según la fase que se trate. Las fases orgánicas, las interfases y el etanol sobrenadante se resuspendieron en 50 µL de dimetilsulfóxido al 5 % (DMSO), mientras que las fases acuosas fueron resuspendidas en 50 µL agua destilada. Una vez resuspendidas, se cuantificaron la cantidad de proteínas de cada una de las muestras con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®, Wilmington, MA, USA) para después normalizar estas concentraciones a 2 mg/mL para, así, alcanzar la concentración deseada de 1 mg/mL en el ensayo antibacteriano.

### **3.3 Ensayo de difusión en agar**

Esta técnica consiste en el cultivo de bacterias en placas de agar y la deposición de discos de papel impregnados en la sustancia antibacteriana a estudio para que, tras el crecimiento de la bacteria, se haga visible la actividad de las mismas mediante los denominados halos de inhibición alrededor de los discos (74).

Para este ensayo se utilizó los antibióticos kanamicina, gentamicina, ciprofloxacino y cloranfenicol, a unas concentraciones de stock de 25 mg/mL, 50 mg/mL, 2 mg/mL y 34 mg/mL respectivamente; y fueron probados frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los ensayos realizados con esta última fueron llevados a cabo en el Hospital de Alicante.

En cuanto al procedimiento, las bacterias se cultivaron en placas de Agar Müller Hinton preparadas con antelación, vertiendo 50 µL del preparado bacteriano normalizado a  $3 \cdot 10^6$  ufc/mL y distribuyendo uniformemente por la superficie del agar con un asa de siembra en condiciones de esterilidad. Tras ello, se impregnaron con 15 µL de los respectivos antibióticos en discos de papel Whatmann de 5 mm de diámetro y fueron depositados en la placa donde se esparció la bacteria. Una vez realizado se dejaron en el incubador a 37 °C durante toda la noche. Para comprobar la sensibilidad y eficacia de la técnica se probaron diferentes diluciones de los antibióticos: por un lado, las diluciones 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, y por otro, 1:50, 1:100, 1:200.

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de estudiar la sensibilidad de este método para los posteriores ensayos antibacterianos con el moco de pez.

### **3.3 Ensayo de dilución seriada en caldo de cultivo**

Este método es utilizado para estimar la inhibición del crecimiento microbiano mediante una técnica de dilución en serie. Con este método se observa la inhibición del crecimiento de los organismos microbianos viables a partir de una única placa de dilución sin necesidad de placas repetidas (75).

Para la realización de este ensayo se utilizaron placas multipocillo para cultivo celular (SPL LIFE SCIENCE®). Se vertieron 50 µL del agente inhibidor del crecimiento bacteriano en el primer pocillo de cada fila, contando entonces con volúmenes de estos compuestos a sus concentraciones de *stock*, y 25 µL de H<sub>2</sub>O o DMSO 5 % en el resto de los pocillos de la fila dependiendo del tipo de muestra del que se utilice en el proceso. Tras ello, se realizó una dilución seriada del agente inhibitorio mediante el paso de 25 µL del mismo al pocillo siguiente y siguiendo este mismo procedimiento hasta alcanzar el último pocillo de cada fila. De esta manera, se fue reduciendo a la mitad la concentración del compuesto, obteniendo un rango de concentraciones decrecientes. Este método fue utilizado con diferentes fines en este proyecto.

#### **3.3.1 Ensayos antimicrobianos con el moco de pez**

Estos ensayos fueron realizados con el objetivo de testar el potencial antibacteriano de las diferentes muestras de moco de pez. Se probó la actividad de las diferentes fases

obtenidas de la extracción del moco: las fases acuosas, las fases orgánicas, las interfases y el etanol sobrenadante extraído en el proceso inicial de lavado del moco.

En cuanto al procedimiento, se utilizaron placas multipocillo para cultivo celular (SPL LIFE SCIENCE<sup>®</sup>) y fueron clasificadas por filas. En la primera fila de pocillos se realizaron los controles pertinentes para cada muestra: un control de DMSO 5 % (50 µL) para las fases orgánicas, las interfases y el etanol sobrenadante; un control de H<sub>2</sub>O (50 µ) para las fases acuosas; un control de bacterias (25 µL bacterias y 25 µL caldo de cultivo Müller Hinton), y un control de Müller Hinton para cerciorarse de que no esté contaminado. En las siguientes filas se realizó el ensayo propiamente dicho, en el cual se probaron las distintas fases de moco tras la extracción. Para ello, se colocaron 50 µL de cada una de las muestras en los primeros pocillos de cada fila y se realizó la dilución seriada de la muestra pasando 25 µL de la misma a los pocillos sucesivos, previamente llenados con 25 µL de H<sub>2</sub>O o DMSO 5 % dependiendo de la fase que se esté estudiando.

Una vez vertidas las muestras y preparados los controles, colocamos 25 µL de bacterias en los pocillos donde se encuentran las fases del moco. Las bacterias se encontraban a una concentración stock de  $5,6 \cdot 10^9$  ufc/mL (ufc, unidades formadoras de colonias) para *Escherichia coli* y  $2,36 \cdot 10^9$  ufc/mL para *Staphylococcus aureus* y fueron llevadas a una concentración resultante de una dilución 1:100 de un estándar 0,5 *McFarland* ( $1,5 \cdot 10^6$  ufc/mL).

Las placas se depositaron en un incubador, dejándolas toda la noche a una temperatura de 37°C.

### **3.3.2 Actividad del moco de pez junto a antibióticos**

En estos experimentos, el ensayo se vio ligeramente modificado. En el primer pocillo de cada fila se introdujeron 50 µL de una disolución de kanamicina o ampicilina a una concentración concreta en la muestra de moco (para el ensayo de actividad), en agua (para los controles de la fase acuosa) y en DMSO 5 % (para los controles de la fase orgánica, interfase y etanol sobrenadante). Estos controles con agua y DMSO 5 % nos sirven para cerciorarnos de la correcta función del antibiótico testado frente a las bacterias que probamos en los experimentos, así como de comparativa frente a los ensayos de moco junto con el antibiótico. En el resto de pocillos de las filas se vertieron 25 µL del moco, agua o DMSO 5 % y se realizó

la dilución seriada pasando 25  $\mu\text{L}$  del pocillo principal al siguiente, de este al que le precede y así sucesivamente hasta llegar al final de la fila. Se descartaron los 25  $\mu\text{L}$  de mezcla sobrante.

#### **3.3.2.1 Kanamicina**

Para los ensayos contamos con kanamicina a una concentración de *stock* de 25 mg/mL. En primer lugar, se realizó una dilución 1:5 en  $\text{H}_2\text{O}$  para obtener el antibiótico a una concentración de 5 mg/mL en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  (80  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 20  $\mu\text{L}$  de kanamicina). Tras esto, se diluyó una segunda vez la kanamicina con la intención de alcanzar una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para ello se llevó a cabo una dilución 1:100 con  $\text{H}_2\text{O}$  o DMSO, para poder utilizarla frente a la fase acuosa y para las fases orgánicas, interfases, y etanol de los sobrenadantes respectivamente. Esta dilución se realizó para un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  (99  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  y 1  $\mu\text{L}$  de kanamicina 5 mg/mL).

#### **3.3.2.2 Ampicilina**

Para los ensayos contamos con ampicilina a una concentración de *stock* de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se realizó una dilución 1:100 en  $\text{H}_2\text{O}$  para obtener el antibiótico a una concentración de 1 mg/mL en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  (99  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 1  $\mu\text{L}$  de ampicilina). Se realizó una segunda dilución 1:50 (98  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  y 2  $\mu\text{L}$  de ampicilina) con  $\text{H}_2\text{O}$  o DMSO hasta alcanzar 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **3.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos**

Antes de realizar los experimentos anteriores, se determinó cuáles serían las concentraciones mínimas de cada uno de los antibióticos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en condiciones normalizadas. Este procedimiento se llevó a cabo para kanamicina (25 mg/mL) y ampicilina (100 mg/mL).

Para la realización de este ensayo se utilizaron placas multipocillo para cultivo celular (SPL LIFE SCIENCE<sup>®</sup>). Se vertieron 50  $\mu\text{L}$  de los respectivos antibióticos en el primer pocillo de cada fila, contando entonces con volúmenes de los antibióticos a sus concentraciones de *stock*, y 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  en el resto de los pocillos de la fila. Tras ello, se realizó una dilución seriada del antibiótico pasando 25  $\mu\text{L}$  del mismo al pocillo siguiente y siguiendo este mismo procedimiento hasta alcanzar el último pocillo de cada fila. De esta manera, se fue reduciendo a la mitad la concentración de antibiótico, obteniendo un rango de concentraciones decrecientes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de moco de anguila

Para determinar el potencial antibacteriano del moco de anguila, se realizaron ensayos de dilución en placas multipocillo, en el cuales se probaron los productos del moco tras el procedimiento de extracción orgánica directamente frente a bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

Para estos ensayos se contó con diferentes lotes de moco, clasificados según la fecha de su extracción, como podemos observar en la Tabla 6. Cada uno de ellos contó con concentraciones diferentes y, por tanto, fueron resuspendidos en diferentes volúmenes de etanol en los estadios primarios del proceso, para la normalización de las concentraciones a 1 mg/mL.

**Tabla 6.** Esquema de los lotes utilizados para la extracción orgánica.

Lote	Volumen inicial ( $\mu\text{L}$ )	Concentración de proteínas (mg/mL)	Volumen EtOH 95 % ( $\mu\text{L}$ )
Lote 1	3000	0,65	1950
Lote 2	500	0,59	295
Lote 3	500	0,41	1200
Lote 4	500	0,56	280

**Tabla 6.** En esta tabla podemos observar los distintos lotes usados para la extracción orgánica, así como las concentraciones de proteínas de cada uno de ellos y los volúmenes de etanol utilizados para llegar a la concentración deseada de 1 mg/mL en cada uno de ellos. Lote 1 extraído el 22/03/2021; lote 2 extraído el 29/03/2021; lote 3 extraído el 07/04/2021; lote 4 extraído el 13/04/2021.

Todos estos lotes fueron divididos en diferentes alícuotas con el fin de ser probados con los 3 disolventes de la extracción orgánica (diclorometano, acetato de etilo y dietiléter).

#### 4.1.1 Extracción con diclorometano

Para el diclorometano, el primer lote utilizado fue una alícuota de 3 mL del lote 1. Este lote presentaba una cantidad de proteínas de 3000  $\mu\text{g}$ ; una vez realizada la extracción, se midió la concentración proteica de cada una de las fases y se obtuvo 200  $\mu\text{g}$  de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 6,67 %) y 586  $\mu\text{g}$  de proteínas en la fase orgánica (rendimiento



del 19,53 %). No se obtuvo interfase alguna en este lote. En cuanto a la actividad antibacteriana, el ensayo no presentó inhibición del crecimiento de *E. coli*.

El siguiente lote utilizado fue el extraído el lote 2. Se usaron dos alícuotas diferentes (de 500 µL cada una) de este lote para la extracción orgánica con diclorometano. Debido a la normalización de las concentraciones a 1 mg/mL, ambas alícuotas contaban con una cantidad de proteínas de 500 µg. Tras la extracción, la primera alícuota contó con 15 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 3 %) y 63 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 12,6 %) y no se obtuvo interfase de la misma. La segunda alícuota contó con 12,5 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 2,5 %) y 3,5 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 0,7 %) y 9,5 µg de proteínas en la interfase (rendimiento del 1,9 %). Ninguna de estas fases presentó en el ensayo antimicrobiano actividad antibacteriana.

Otro lote utilizado fue el extraído el lote 3. Se usó una alícuota de 3 mL que contaba con una cantidad de proteínas de 3000 µg. Tras la extracción se obtuvieron 193 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 6,43 %) y 200 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 6,67 %) y no se obtuvo interfase. Este lote presentó actividad nula en cuanto al ensayo antibacteriano.

Otro lote utilizado fue el extraído el lote 4. Se usaron dos alícuotas de 500 µL cada una que contaban con una cantidad de proteínas de 500 µg. Tras la extracción, la primera alícuota contó con 27,5 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 5,5 %) y 115 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 23 %) y no se obtuvo interfase de la misma. La segunda alícuota contó con 70 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 14 %) y 6 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 1,2 %) y 0,5 µg de proteínas en la interfase (rendimiento del 0,1 %). Este lote tampoco presentó ningún potencial antibacteriano en el ensayo realizado frente a *E. coli*.

#### **4.1.2 Extracción con dietiléter**

Para el dietiléter, el primer lote utilizado fue el extraído el lote 2. Se usaron una alícuota de 3 mL y otra de 500 µL para la extracción orgánica con este lote. Debido a la normalización de las concentraciones a 1 mg/mL, la primera alícuota contaban con una cantidad de proteínas de 3000 µg, y la segunda de 500 µg. Tras la extracción, la primera alícuota contó con 268 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 8,93 %) y 266 µg de proteínas en la fase

orgánica (rendimiento del 8,67 %). La segunda alícuota contó con 91 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 18,2 %) y 92 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 18,4 %). No se obtuvo interfase de ninguna de las alícuotas del lote del Lote 2 extraídas con dietiléter. Asimismo, ninguna de estas fases presentó actividad antibacteriana en el ensayo antimicrobiano.

Otro lote utilizado fue el extraído el lote 3. Se usó una alícuota de 3 mL que contaba con una cantidad de proteínas de 3000 µg. Tras la extracción se obtuvieron 3 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 0,1 %) y 340 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 11,33 %) y 470 µg de proteínas en la interfase (rendimiento del 15,7 %). Este lote presentó actividad nula en cuanto al ensayo antibacteriano.

Otro lote utilizado fue el extraído el lote 4. Se usó una alícuota de 500 µL que contaba con una cantidad de proteínas de 500 µg. Tras la extracción se obtuvieron 60 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 12 %) y 28,5 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 5,7 %). Este lote no presentó actividad en cuanto al ensayo antibacteriano se refiere.

#### **4.1.3 Extracción con acetato de etilo**

Para el acetato de etilo, el primer lote utilizado fue el extraído el lote 2. Se usó una alícuota de 500 µL que contaba con una cantidad de proteínas de 500 µg. Tras la extracción se obtuvieron 112 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 24,4 %) y 6 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 1,2 %). No se obtuvo interfase para este lote. Este lote presentó actividad nula en cuanto al ensayo antibacteriano.

Otro lote utilizado fue el extraído el lote 3. Se usó una alícuota de 500 µL que contaba con una cantidad de proteínas de 500 µg. Tras la extracción se obtuvieron 75 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 15 %) y 32,5 µg de proteínas en la fase orgánica (rendimiento del 6,5 %). Este lote tampoco presentó interfase. En cuanto a la actividad antibacteriana, esta fue nula para este lote.

Otro lote utilizado fue el extraído el lote 4. Se usó una alícuota de 3 mL que contaba con una cantidad de proteínas de 3000 µg. Tras la extracción se obtuvieron 9 µg de proteínas en la fase acuosa (rendimiento del 0,3 %) y 120 µg de proteínas en la fase orgánica

(rendimiento del 4 %). No se obtuvo interfase. Este lote no presentó potencial inhibitorio para el crecimiento bacteriano.

Como podemos observar, ninguna muestra del moco de anguila extraído con el protocolo orgánico presentó actividad antibacteriana. Asimismo, los rendimientos obtenidos en cuanto a la cantidad de proteínas con las que contaban cada una de las fases de la extracción fueron muy bajos; siendo más bajos para las fases acuosas que para el resto de fases.

En la Tabla 7 podemos observar, de manera más esquemática, los resultados obtenidos de la extracción orgánica de moco epidérmico de anguila.

**Tabla 7:** Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de moco de anguila.

Lote	Cant. proteína inicial (µg)	Cant. proteína final Fase acuosa (µg)	Rto. Fase acuosa (%)	Cant. proteína final Fase orgánica (µg)	Rto. Fase orgánica (%)	Cant. proteína final Interfase (µg)	Rto. Interfase (%)	Actividad
<b>Diclorometano</b>								
Lote 1	3000	200,0	6,67	586,0	19,53	-	-	-
Lote 2	500	15,0	3,00	63,0	12,60	-	-	-
Lote 2	500	12,5	2,50	3,5	0,70	9,5	1,9	-
Lote 3	3000	193,0	6,43	200,0	6,67	-	-	-
Lote 4	500	27,5	5,50	115,0	23,00	-	-	-
Lote 4	500	70,0	14,00	6,0	1,20	0,5	0,1	-
<b>Dietiléter</b>								
Lote 2	3000	268	8,93	266,0	8,87	-	-	-
Lote 2	500	91	18,20	92,0	18,40	-	-	-
Lote 3	3000	3	0,10	340,0	11,33	470	15,7	-
Lote 4	500	60	12,00	28,5	5,70	-	-	-
<b>Acetato de etilo</b>								
Lote 2	500	112	22,40	6,0	1,20	-	-	-
Lote 3	500	75	15,00	32,5	6,50	-	-	-
Lote 4	3000	9	0,30	120,0	4,00	-	-	-

Cant., cantidad; Rto., rendimiento; -, nulo/a.

#### **4.2 Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de moco de trucha**

Para estudiar la actividad antibacteriana del moco de trucha, se realizaron ensayos de dilución en placas multipocillo, en el cual se probaron los extractos orgánicos del moco epidérmico de estos peces frente a bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

La concentración inicial de proteínas en cada uno de los lotes fue de 18 mg/mL aproximadamente (con un error relativo de  $\pm 0,1$ ). Para normalizar todos los tubos a una concentración de 1 mg/mL, los lotes fueron resuspendidos en 3,6 mL de etanol 95 % y divididos en 2 alícuotas de 1,8 mL cada una en los primeros pasos de la extracción orgánica. Debido a esta normalización, la cantidad de proteína inicial en cada uno de los lotes fue de 3600  $\mu\text{g}$ .

Tras realizar los procedimientos correspondientes de la extracción orgánica, se observó que, en cada uno de los lotes, las fases orgánicas y las acuosas contaban con valores de concentración prácticamente idénticos (con error relativo de  $\pm 0,02$ ), por tanto, el cálculo del rendimiento obtenido con la extracción se realizó por lotes. Además, en ninguno de los casos se obtuvo interfase.

En el lote control (PBS 1.3), se obtuvieron 3595,3  $\mu\text{g}$  de proteína y, por lo tanto, un rendimiento del 99,9 %. En el lote LPS 2.1, la cantidad de proteína tras la extracción fue de 3175  $\mu\text{g}$ , obteniéndose un rendimiento del 88,2 %. En el lote LPS 2.3 se obtuvo 2672,6  $\mu\text{g}$  (rendimiento del 74,2 %). En el lote LPS 5.1, 2363,3  $\mu\text{g}$  de proteína (rendimiento del 65,6 %). En el lote LPS 5.3, 2531,2  $\mu\text{g}$  de proteína (rendimiento del 70,3 %). En el lote PIC 3.1, 1884,9  $\mu\text{g}$  de proteína (rendimiento del 52,4 %). En el lote PIC 3.3, 3577,1  $\mu\text{g}$  de proteína (rendimiento del 99,4 %). En el lote PIC 6.1, 3423,6  $\mu\text{g}$  de proteína (rendimiento del 95,1 %). En el lote PIC 6.3, 3520,9  $\mu\text{g}$  de proteína (rendimiento del 97,8 %). En la Tabla 8 podemos observar de manera más esquemática los resultados obtenidos de la extracción orgánica del moco epidérmico de las truchas.

**Tabla 8:** Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de moco de trucha.

Lote	Cant. Proteína inicial (µg)	Cant. Proteína final (µg)	Rto. (%)	Actividad
<b>Diclorometano</b>				
PBS 1.3	3600	3595,3	99,9	Nula
LPS 2.1	3600	3175,0	88,2	Nula
LPS 2.3	3600	2672,6	74,2	Nula
LPS 5.1	3600	2363,3	65,6	Nula
LPS 5.3	3600	2531,2	70,3	Nula
PIC 3.1	3600	1884,9	52,4	Nula
PIC 3.3	3600	3577,1	99,4	Nula
PIC 6.1	3600	3423,6	95,1	Nula
PIC 6.3	3600	3520,9	97,8	Nula

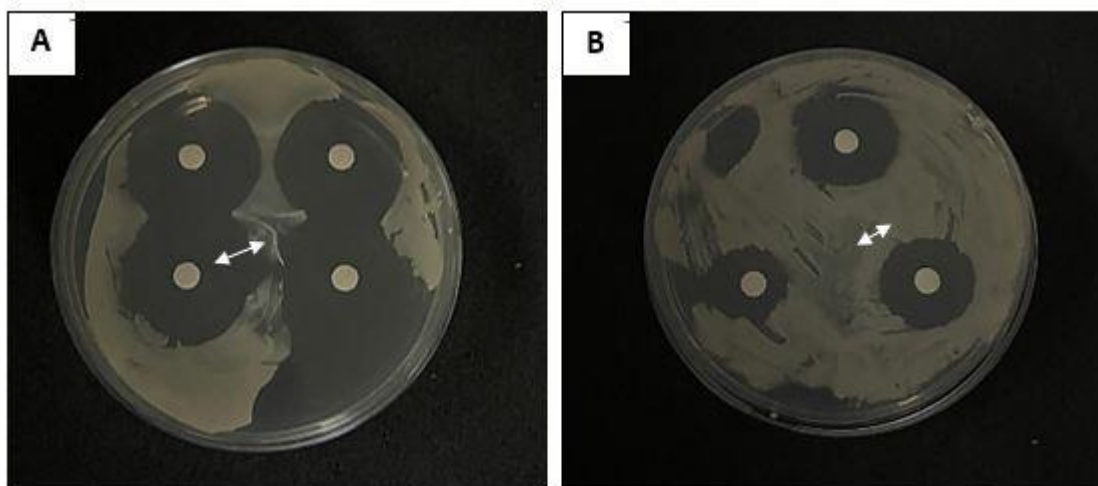
Cant., cantidad; Rto., rendimiento.

Como podemos observar, con el moco de las truchas se obtuvieron valores de rendimiento con la extracción orgánica mucho mayores que con el moco de anguila. Sin embargo, en cuanto a la actividad antibacteriana, ninguno de ellos presento capacidad inhibitoria en el crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*.

### 4.3 Ensayos de difusión en agar

El objetivo del ensayo realizado con los antibióticos kanamicina, gentamicina, cloranfenicol y ciprofloxacino, fue determinar la sensibilidad de la técnica en cuestión.

Tras incubar las placas durante 24 h a 37°C, se pudo observar pequeños halos de inhibición rodeando los discos de papel *Whatmann* impregnados con los antibióticos a diferentes diluciones. Con una regla estándar medimos la longitud del radio de estos halos. En la Figura 3 podemos observar dos ejemplos en los cuales se diferencia este halo de inhibición claramente.



**Figura 3. Ejemplos de resultados obtenidos con la técnica de difusión en agar.** La primera placa (A) es el resultado de la utilización de ciprofloxacino a unas diluciones de 1:2 (arriba derecha); 1:5 (arriba izquierda), 1:10 (abajo derecha), 1:20 (abajo izquierda). La segunda placa (B) es el resultado de la utilización de ciprofloxacino a unas diluciones de 1:50 (arriba), 1:100 (abajo izquierda), 1:200 (abajo derecha). Ambas placas fueron incubadas con *Staphylococcus aureus*. La flecha indica la zona de medición para obtener el radio del halo de inhibición.

En cuanto a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas entre los halos de inhibición que produjo el uso de antibióticos a las diferentes diluciones a las que se llevó a cabo el experimento. Debido a esto, se valoró que la técnica de difusión en agar no presentaba la sensibilidad esperada para su uso con el moco de pez y se decidió descartar esta técnica para el resto de ensayos antimicrobianos. En las siguientes tablas (Tabla 9 y Tabla 10) se puede observar los resultados obtenidos. Para este ensayo se utilizaron los antibióticos kanamicina, gentamicina, ciprofloxacino y cloranfenicol, a unas concentraciones de stock de 25 mg/mL, 50 mg/mL, 2 mg/mL y 34 mg/mL

**Tabla 9.** Resultados en cm del radio de inhibición tras la inoculación de *S. aureus* y distintas concentraciones de varios antibióticos

Antibióticos <sup>1</sup>	Radio halo de inhibición (cm)						
	1:2	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200
<b>Ciprofloxacino</b>	1,4	1,1	0,9	0,7	0,9	0,8	0,4
<b>Cloranfenicol</b>	1,8	1,3	1,2	1	-	-	-
<b>Kanamicina</b>	0,6	0,5	0,4	0,3	0,8	0,7	0,3
<b>Gentamicina</b>	0,7	0,6	0,6	0,5	0,8	0,7	0,6

No se obtuvieron resultados coherentes para la placa de *S. aureus* con las diluciones 1:50, 1:100 y 1:200 de cloranfenicol. Fue repetida hasta 3 veces y no se produjeron los halos pertinentes.

**Tabla 10.** Resultados en cm del radio de inhibición tras la inoculación de *E. coli* y distintas concentraciones de varios antibióticos

Antibióticos <sup>1</sup>	Radio halo de inhibición (cm)						
	1:2	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200
<b>Dilución</b>							
<b>Ciprofloxacino</b>	1,3	1	0,9	0,8	1,4	1,2	1
<b>Cloranfenicol</b>	-	-	-	-	0,7	0,5	0,4
<b>Kanamicina</b>	1,1	0,9	0,8	0,7	0,1	0,15	0,25
<b>Gentamicina</b>	1	0,9	0,8	0,6	0,6	0,5	0,3

No se obtuvieron resultados coherentes para la placa de *E. coli* con las diluciones 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20 de cloranfenicol. Fue repetida hasta 3 veces y no se produjeron los halos pertinentes.

#### 4.4 Ensayos de dilución seriada en caldo de cultivo

##### 4.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos.

Tras realizar el ensayo de dilución correspondiente, se obtuvieron cuáles serían las concentraciones mínimas a las cuales los antibióticos cuenta con actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano. El objetivo de realizar este ensayo fue el de tener una idea concreta del rango de concentraciones en el que los antibiótico kanamicina y ampicilina son funcionales para, así, poder realizar la comparación pertinente al probar estos antibióticos junto a las muestras de moco de anguila y trucha.

Se obtuvo que la concentración mínima inhibitoria de la kanamicina es 0,8 µg/mL, y la de la ampicilina de 5 µg/mL.

##### 4.4.2 Actividad de los antibióticos junto a moco de anguila

###### 4.4.2.1 Kanamicina

Para la realización de estos ensayos se utilizaron diferentes lotes (lote 2; lote 3; lote 4), cada uno de ellos extraídos con un disolvente diferente (dietiléter, diclorometano y acetato de etilo respectivamente). De esta manera, se realizaron los experimentos en variedad de condiciones en cuanto a la extracción de moco en crudo y las diferentes metodologías utilizadas para la extracción orgánica.

El objetivo del ensayo fue observar si el moco reducía la concentración necesaria de antibiótico para la inhibición de crecimiento bacteriano. Por ello, primeramente, se realizaron unos controles con H<sub>2</sub>O y DMSO 5 % para observar cuál sería el valor de esta concentración en condiciones sin moco.

En cuanto a los resultados obtenidos con el moco, para el lote del Lote 2 (extraído con dietiléter) se observó que, con una concentración de proteínas de 4,70 mg/mL para la fase orgánica y de 2,60 mg/mL para la fase acuosa, contaron con una MIC de 3,125 µg/mL. En el lote del Lote 3 (extraído con diclorometano), la fase orgánica contaba con una concentración proteica de 6,5 mg/mL y produjo una MIC de 0,800 µg/mL; la fase acuosa contaba con una concentración de proteínas de 3,5 mg/mL y se observó una MIC de 3,125 µg/mL, y el etanol sobrenadante obtenido en los primeros pasos de la extracción de este lote, cuya concentración de proteínas fue de 1,91 mg/mL, produjo una MIC de 1,600 µg/mL. Por último, con el lote del Lote 4 (extraído con acetato de etilo) obtuvimos una fase orgánica con una concentración proteica de 8,18 mg/mL que dio una MIC de 3,125 µg/mL, y una fase acuosa, cuya concentración fue de 4,5 mg/mL, produjo una MIC de 1,600 µg/mL.

Como podemos observar, en ninguno de los casos los extractos orgánicos de moco de anguila mejoran la actividad de los antibióticos frente a *Escherichia coli*. Los resultados reflejan un empeoramiento de estos valores con el uso del moco.

En la Tabla 13 podemos ver los resultados de manera más esquemática y clara.

**Tabla 13:** Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de moco de trucha.

Lote	Fase	Disolvente	[Proteínas] <sup>1</sup>	MIC (µg/mL)
Lote 2	Orgánica	Dietiléter	4,70	3,125
Lote 2	Acuosa	Dietiléter	2,60	3,125
Lote 3	Orgánica	Diclorometano	6,51	0,400
Lote 3	Acuosa	Diclorometano	3,50	3,125
Lote 4	Orgánica	Acetato de etilo	8,18	3,125
Lote 4	Acuosa	Acetato de etilo	4,50	1,600

1. Concentración de proteínas en mg/mL.

#### 4.4.2.2 Ampicilina

Para este ensayo se utilizaron dos lotes, ambos extraídos con diclorometano ya que fue el disolvente que mejores resultados ha brindado. Los lotes utilizados fueron el del lote 1 y el del lote 2.

Para el lote del lote 1 se obtuvo una fase orgánica cuya concentración de proteínas de 2,93 mg/mL, y una fase acuosa con una concentración de 1,00 mg/mL. Para el lote del Lote 2



se obtuvo una fase orgánica con una concentración de proteínas de 1,33 mg/mL, y una fase acuosa con una concentración proteica de 1,34 mg/mL.

Debido a que se conocía la MIC en condiciones control (H<sub>2</sub>O y DMSO 5 %), la cual contó con un valor de 5 µg/mL, se realizó la dilución de ampicilina únicamente para 3 pocillos por cada una de las filas (tanto para los controles como para el ensayo con las muestras). El primer pocillo contó una concentración de 10,0 µg/mL de ampicilina y, por tanto, el segundo tuvo una concentración igual a la MIC (5 µg/mL), y el tercero, de 2,5 µg/mL.

En cuanto a los resultados obtenidos, en los controles de H<sub>2</sub>O y DMSO 5 %, las bacterias vieron inhibido su crecimiento hasta el tercer pocillo, lo cual fue lo que se esperaba ya que este contaba con una concentración subinhibitoria de ampicilina. Para la fase orgánica del lote del Lote 2, no hubo inhibición del crecimiento bacteriano, por tanto, la muestra empeoró la actividad de la ampicilina. Para las fases acuosas de ambos lotes, las bacterias comenzaron a crecer en el tercer pocillo (2,5 µg/mL.), por tanto, mantuvo el valor de la MIC y no varió la actividad de la ampicilina por si sola. Por último, para la fase orgánica del lote 1 no hubo crecimiento bacteriano en ningún pocillo, lo cual atisba una mejora de la actividad de la ampicilina.

#### **4.4.3 Actividad de los antibióticos junto a moco de trucha**

Para este ensayo se utilizaron tanto las fases acuosas como las fases orgánicas de cada uno de los lotes de moco de trucha extraídos en los días 1 y 2 (habiendo pasado 1 y 3 días respectivamente desde el comienzo del tratamiento). Todas ellas fueron extraídas con diclorometano, ya que fue el disolvente que mejores resultados nos proporcionó en la extracción orgánica del moco de anguila.

Cada uno de los lotes contaba con una concentración de proteínas distinta y, por tanto, cada una fue resuspendida en un volumen de H<sub>2</sub>O o DMSO 5 % diferente con el fin de normalizar todas las concentraciones a 2mg/mL. En la Tabla 14 se puede observar cada uno de los lotes y sus correspondientes concentraciones y volúmenes.

**Tabla 14:** Tabla resumen de las concentraciones de los lotes de moco de trucha

<b>Lote</b>	<b>[Proteínas]<sup>1</sup></b>	<b>Volumen resuspendido (μL)</b>
<b>PBS 1.3</b>	7,16	558
<b>LPS 2.1</b>	10,50	950
<b>LPS 2.3</b>	23,12	1056
<b>LPS 5.1</b>	6,87	244
<b>LPS 5.3</b>	7,11	256
<b>PIC 3.1</b>	6,14	207
<b>PIC 3.3</b>	15,71	686
<b>PIC 6.1</b>	10,41	421
<b>PIC 6.3</b>	17,59	780

1. Concentración de proteínas en mg/mL.

Se dividió la placa multipocillo en columnas según los lotes con los que se contaba para realizar la dilución seriada. Además, se realizó un control con ampicilina y agua para comprobar el correcto funcionamiento del antibiótico en condiciones normales.

En cuanto a los resultados obtenidos, la columna control proporcionó los resultados esperados, ya que las bacterias vieron inhibido su crecimiento hasta el pocillo correspondiente a la concentración de 3,125 μg/mL, a partir del cual la bacteria creció. Este resultado concuerda con la MIC calculada anteriormente de 5 μg/mL. En el resto de columnas, en las cuales estudiamos el efecto del antibiótico junto a los diferentes extractos de moco de trucha, la bacteria no vio inhibido su crecimiento. Este hecho concluye que el moco de trucha no favorece la actividad de la ampicilina, sino que la empeora.

## 5. DISCUSIÓN

Los peces están en constante interacción con su medio acuático, que contiene una amplia gama de microorganismos patógenos y no patógenos. Debido a esto, cabría esperar encontrar una gran cantidad de compuestos con actividad antibacteriana en las barreras protectoras de estas especies (piel y mucosas).

En este proyecto se ha tratado demostrar el potencial antibacteriano con el que cuentan las mucosas epidérmicas de los peces, más concretamente de la anguila (*Anguilla anguilla*) y la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello, se llevó a cabo la purificación del moco mediante métodos de extracción orgánica y probamos estos extractos orgánicos frente a las bacterias *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) mediante diferentes ensayos antimicrobianos como la dilución en caldo de cultivo.

En cuanto a la extracción orgánica realizada, nuestro protocolo fue basado en estudios anteriores en los cuales se llevó a cabo esta metodología (Subramanian *et al.* (2008) (70), Rao *et al.* (2015) (71) y Lee *et al.* (2020) (72)). En este protocolo se utilizó etanol al 95 % en volumen para resuspender los productos de la extracción primaria del moco posteriormente liofilizados. Tras esta resuspensión, la muestra con etanol fue sometido a varias centrifugaciones y lavados del precipitado, de los cuales nos quedamos con el etanol sobrenadante en cada una de ellas ya que en el etanol retiene moléculas pequeñas tales como metabolitos secundarios procedentes del moco (73). Siguiendo con el protocolo, la extracción se realiza mediante el uso de disolventes orgánicos, lo cual provoca la aparición de dos fases en las muestras de moco, una fase orgánica y una fase acuosa (en algunos casos también aparece una delgada interfase entre ambas). En cada una de las fases se obtienen compuestos de diferentes características. En la fase orgánica quedan retenidas los productos proteicos y moléculas hidrofóbicas o apolares y en la acuosa, aquellas moléculas hidrofílicas o polares (75). Por ello, probamos todas las fases por separado, para, así, conocer qué componentes del moco de pez son los que presentan actividad antibacteriana.

En cuanto a los resultados obtenidos con los extractos orgánicos del moco epidérmico de la anguila, el potencial antibacteriano obtenido en diferentes estudios tales como el desarrollado en 2002 por Hellio *et al.* (76), no se han observado en el presente estudio. En las condiciones experimentales en las que los extractos orgánicos del moco de anguila fueron probados, no se ha observado actividad antibacteriana frente a ninguna de las bacterias

probadas. Esta variación en los resultados obtenidos ha podido darse por diferentes causas. En primer lugar, la especie utilizada puede no producir los componentes antimicrobianos suficientes para la inhibición del crecimiento bacteriano, tal y como defiende otro estudio realizado por Shephard *et. al.* (77) en 1984, el cual postula que las células productoras de moco en la capa epidérmica y epitelial difieren entre las especies de peces y, por lo tanto, podrían influir en la composición del moco. Asimismo, debido a que las anguilas proceden de piscifactoría, es posible que, debido a no proceder de hábitats salvajes, no cuenten con un sistema inmune suficientemente desarrollado como para contar con suficiente cantidad de compuestos antimicrobianos en las secreciones epidérmicas de moco (78). Otro estudio realizado en 2008 defiende que las moléculas pequeñas extraídas mediante disolventes orgánicos pueden no ser los componentes antimicrobianos más activos de las mucosas de las anguilas, por tanto, este puede ser otro de los motivos por el cual no obtuvimos los resultados esperados con estos extractos (70).

Debido a los resultados obtenidos, se optó por la utilización de otras especies de peces, como la trucha. Además, estos peces fueron sometidos a un tratamiento de inmunoestimulación, ya que, al tratarse también de peces procedentes de piscifactoría, quisimos mejorar las condiciones en cuanto al desarrollo de su sistema inmune se refiere. Para este tratamiento utilizamos inmunoestimulantes basados en PAMPS (Poly I:C y LPS). El Poly I:C es un inmunoestimulante similar en estructura al ARN de doble cadena presente en ciertos virus y un activador natural del TLR3 (*Toll-like receptor 3*) (79). El LPS, por otro lado, es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas y es reconocido por las células inmunes a través del *Toll-like receptor 4* (TLR4) (71). Sin embargo, los extractos orgánicos de las truchas tampoco mostraron ninguna actividad antibacteriana frente a las bacterias usadas.

En vista de los resultados, se concluyó en la posibilidad de utilizar los extractos de moco junto a antibióticos cuyos mecanismos moleculares favorezcan la entrada de los compuestos antimicrobianos del moco en las bacterias. Por ello, se probó la actividad del moco epidérmico de la trucha y la anguila con kanamicina y ampicilina. La kanamicina, por un lado, pertenece a la familia de los aminoglucósidos, cuya diana molecular es el ARN celular e inhibe la replicación bacteriana (80). Estudios anteriores han demostrado que los aminoglucósidos alteran las membranas bacterianas (80), por ello, creemos que la actividad del moco se verá amplificada

gracias a esta mejora de la entrada a las células bacterianas de los compuestos que le otorgan la actividad antimicrobiana al moco. Por otro lado, la ampicilina es el primer derivado de la penicilina, utilizado para tratar infecciones bacterianas desde el año 1961, que pertenece a la familia de los  $\beta$ -lactámicos cuya actividad es la inhibición de la síntesis de la pared celular durante la replicación celular en bacterias gran positivas y gran negativas (81). Debido estos mecanismos moleculares y dianas de acción de estos antibióticos, se opinó que mejoraría su actividad si estos iban acompañados de los extractos de moco, sin embargo, se observó que los antibióticos presentaban una igual o actividad antibacteriana cuando fueron combinados con los extractos de moco. Este resultado cercioró aún más de la nula actividad antibacteriana de los extractos de moco de pez en las condiciones experimentales dadas.

## **6. CONCLUSIONES**

En este proyecto se ha tratado de demostrar el potencial antibacteriano de las mucosas epidérmicas de la anguila y la trucha, tras ser sometidas a una extracción con disolventes orgánicos. En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- La extracción orgánica no es un buen método para la purificación del moco epidérmico de los peces, ya que el rendimiento obtenido en cuanto a cantidad de proteínas es muy bajo, sobre todo para las anguilas.
- Los extractos orgánicos de moco no han probado tener actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano. Incluso en truchas sometidas a tratamientos de 1 a 3 días con diferentes inmunoestimulantes (PAMPS).
- Los extractos orgánicos del moco de anguila y truchas no presentan actividad en combinación con antibióticos aminoglucósidos ni  $\beta$ -lactámicos. Más concretamente, empeora la actividad de los mismos.

## **7. PROYECCIÓN DE FUTURO**

Debido a la creciente necesidad de nuevas herramientas para tratar enfermedades infecciosas por la prevalencia de la resistencia a antibióticos, la investigación acerca del potencial del sistema inmune de los peces puede resultar de gran interés. Además, el descubrimiento de nuevas fuentes de productos antibacterianos procedentes de peces puede resultar de gran beneficio para la creciente industria de la acuicultura en todo el mundo, ya que, gracias a estos avances, se propone una nueva vía de mercado en el sector farmacológico, fomentando la economía circular.

Sin embargo, es necesario fomentar y continuar con las investigaciones pertinentes sobre esto, para conseguir una mejor comprensión acerca de la función de la mucosa de los peces y para el desarrollo de técnicas y metodologías más definidas para la extracción de las mucosas epiteliales de los peces.

En lo referente a este proyecto y los resultados obtenido en el mismo, se plantean las siguientes proyecciones de futuro con la intención de vislumbrar nuevas maneras de mejorar la extracción del moco:

- Estudio de especies de peces procedentes de hábitats salvajes, en los cuales se encuentren en continuo contacto con los microorganismos que los albergan. De esta manera, los peces estudiados contarán con un sistema inmune innato más preparado para la defensa frente a bacterias.
- Investigación con otras especies de peces, ya que la actividad antibacteriana de las mucosas depende en gran medida de la variación entre especies.
- Modificar los protocolos de extracción orgánica para obtener extractos con una mayor concentración de proteínas. Con la intención de contar una mayor cantidad de compuestos con capacidad antibacteriana en cada extracto.
- Estudiar el potencial antivírico y antifúngico de los extractos de mucosa de pez, ya que, aunque no haya proporcionado los resultados esperados para las bacterias, puede que sí cuenten con cierta actividad para con estos patógenos.
- Identificación y caracterización de los genes de la piel de las especies de peces estudiadas para mejorar la comprensión de la

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Huang CM, Huang FL, Chien YL, Chen PY. Deep neck infections in children. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2017;50(5):627–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2015.08.020>
2. Haensch S, Bianucci R, Signoli M, Rajerison M, Schultz M, Kacki S, et al. Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the black death. *PLoS Pathog*. 2010;6(10).
3. Macrolide-resistant *M. pneumoniae*. *Epidemiology of Mycoplasma pneumoniae Infections in Japan and Therapeutic Strategies for*. 2016;7(May):1–14.
4. Gomes ES, Schuch V, Lemos EG de M. Biotechnology of polyketides: New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Brazilian J Microbiol*. 2013;44(4):1007–34.
5. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007;70(3):461–77.
6. Pawlowski AC, Johnson JW, Wright GD. Evolving medicinal chemistry strategies in antibiotic discovery. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2016;42:108–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.04.006>
7. Richards et al. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2018;176(5):139–48.
8. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia*. 1996;12(1):9–16.
9. Molchanova N, Hansen PR, Franzyk H. Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs. *Molecules*. 2017;22(9).
10. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *J Am Med Assoc*. 2007;298(15):1763–71.
11. Falagas ME, Bliziotis IA, Kasiakou SK, Samonis G, Athanassopoulou P, Michalopoulos A. Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis*. 2005;5:1–7.
12. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the Magic Mountain: The rise of extensively drug-resistant tuberculosis - Commentary. *Nat Med*. 2007;13(3):295–8.



13. Uyaguari-Díaz MI, Croxen MA, Luo Z, Cronin KI, Chan M, Baticados WN, et al. Human activity determines the presence of integron-associated and antibiotic resistance genes in Southwestern British Columbia. *Front Microbiol.* 2018;9(MAY):1–20.
14. Neu HC, Fu KP. Cefaclor: in vitro spectrum of activity and beta-lactamase stability. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;13(4):584–8.
15. Margină D, Olaru OT, Ilie M, Grădinaru D, Guțu C, Voicu S, et al. Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from *Vitis vinifera*, *Aesculus hippocastanum* and *Curcuma longa*. *Exp Ther Med.* 2015;10(5):1681–8.
16. Hiltunen T, Virta M, Anna-Liisa L. Antibiotic resistance in the wild: An ecoevolutionary perspective. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2017;372(1712).
17. Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, et al. Design of an  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Sci Rep.* 2016;6(May):1–13.
18. Carmona-Ribeiro AM, Carrasco LD de M. Novel formulations for antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):18040–83.
19. Fekih-Zaghib S, Fildier A, Barrek S, Bouhaouala-Zahar B. A complementary LC-ESI-MS and MALDI-TOF approach for screening antibacterial proteomic signature of farmed European Sea bass mucus. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2013;35(2):207–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.017>
20. Kombrink A, Tayyrov A, Essig A, Stöckli M, Micheller S, Hintze J, et al. Induction of antibacterial proteins and peptides in the coprophilous mushroom *Coprinopsis cinerea* in response to bacteria. *ISME J* [Internet]. 2019;13(3):588–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-018-0293-8>
21. Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23(4):411–56.
22. Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, Huang PL, Kung HF, Blithe DL, et al. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in  $\beta$ -core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):2678–81.
23. Matsushita M, Matsushita A, Endo Y, Nakata M, Kojima N, Mizuochi T, et al. Origin of

- the classical complement pathway : Lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. 2004;(17).
24. Fenical W. New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends Biotechnol.* 1997;15(9):339–41.
  25. Cavicchioli R, Bakken LR, Baylis M, Foreman CM, Karl DM, Koskella B, et al. Statement. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019;17(September). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>
  26. Paxton AB, Pickering EA, Adler AM, Taylor JC, Peterson CH. Flat and complex temperate reefs provide similar support for fish: Evidence for a unimodal species-habitat relationship. *PLoS One.* 2017;12(9):1–22.
  27. Toledo-Ibarra GA, Rojas-Mayorquín AE, Girón-Pérez MI. Influence of the cholinergic system on the immune response of teleost fishes: Potential model in biomedical research. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013.
  28. Petter M, Duffy MF. Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations. *Pathog Interact Antigen Var V Somat Adapt* [Internet]. 2015;57(Cohn 1994):47–90. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-20819-0>
  29. Cameron AM, Endean R. Epidermal secretions and the evolution of venom glands in fishes. *Toxicon.* 1973;11(5).
  30. Valero Y, Cortés J, Mercado L. NK-lysin from skin-secreted mucus of Atlantic salmon and its potential role in bacteriostatic activity. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2019;87(November 2018):410–3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.034>
  31. Hellio C, Pons AM, Beaupoil C, Bourgougnon N, Gal Y Le. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *Int J Antimicrob Agents.* 2002;20(3):214–9.
  32. Rose MC, Voynow JA. Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. 2020;245–78.
  33. Ibarz A, Ordo B, Sanahuja I, Sa S, Ferna J, Blasco J, et al. Using stable isotope analysis to study skin mucus exudation and renewal in fish. 2019;

34. Fan C, Wang J, Zhang X, Song J. Functional C1q is present in the skin mucus of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). 2015;102–10.
35. Ekman DR, Skelton DM, Davis JM, Villeneuve DL, Cavallin JE, Schroeder A, et al. Metabolite Profiling of Fish Skin Mucus: A Novel Approach for Minimally-Invasive Environmental Exposure Monitoring and Surveillance. 2015;
36. Valero Y, Arizcun M, Esteban MÁ, Cuesta A, Chaves-Pozo E. Transcription of histones H1 and H2B is regulated by several immune stimuli in gilthead seabream and European sea bass. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2016;57:107–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.019>
37. Swain P, Dash S, Sahoo PK, Routray P, Sahoo SK. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. 2007;22:38–43.
38. Valero Y, Chaves-Pozo E, Meseguer J, Esteban MA, Cuesta A. Biological role of fish antimicrobial peptides. *Antimicrobial Peptides: Properties, Functions and Role in Immune Response*. 2013. 31–60 p.
39. Kumaresan V, Pasupuleti M, Paray BA, Al-Sadoon MK, Arockiaraj J. Gene profiling of antimicrobial peptides, complement factors and MHC molecules from the skin transcriptome of *Channa striatus* and its expression pattern during *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2019;84(September 2018):48–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.061>
40. Lüders T, Birkemo GA, Nissen-Meyer J, Andersen Ø, Nes IF. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone H1 N-terminal peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2399–406.
41. Cuesta A, Meseguer J, Esteban MÁ. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Mol Immunol*. 2008;45(8):2333–42.
42. Bergsson G, Agerberth B, Jörnvall H, Gudmundsson GH. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *FEBS J*. 2005;272(19):4960–9.

43. Yialouris PP, Coles B, Tsitsiloni O, Schmid B, Howell S, Aitken A, et al. The complete and its homologue thymosin. 1992;283:385–9.
44. Cantisani M, Leone M, Mignogna E, Kampanaraki K, Falanga A, Morelli G, et al. Structure-activity relations of myxinidin, an antibacterial peptide derived from the epidermal mucus of hagfish. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5665–73.
45. Jiang S, Jia Y, Lu Z, Shi C, Zhang K. Superplastic Forming/Diffusion Bonding Without Interlayer of 5A90 Al-Li Alloy Hollow Double-Layer Structure. *J Mater Eng Perform*. 2017;26(9):4265–73.
46. Simmaco M, Severini C, De Biase D, Barra D, Bossa F, Roberts JD, et al. Six novel tachykinin- and bombesin-related peptides from the skin of the Australian frog *Pseudophryne güntheri*. *Peptides*. 1990;11(2):299–304.
47. Firth KJ, Johnson SC, Ross NW. Characterization of Proteases in the Skin Mucus of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Infected with the Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and in Whole-Body Louse Homogenate. *J Parasitol*. 2000;86(6):1199.
48. Cho JH, Park IY, Kim HS, Lee WT, Kim MS, Kim SC. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB J*. 2002;16(3):429–31.
49. Esteban A. Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 2015;4007–20.
50. Rajan B, Fernandes JMO, Caipang CMA, Kiron V, Rombout JHWM, Brinchmann MF. Fish & Shellfish Immunology Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2011;31(2):224–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.006>
51. Valdenegro-vega VA, Crosbie P, Bridle A, Leef M, Wilson R, Nowak BF. Fish & Shellfish Immunology Differentially expressed proteins in gill and skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affected by amoebic gill disease. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2014;40(1):69–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.025>
52. Qasba PK, Kumar S. Molecular divergence of lysozymes and  $\alpha$ -lactalbumin. *Crit Rev*

- Biochem Mol Biol. 1997;32(4):255–306.
53. Ye X, Zhang L, Tian Y, Tan A, Bai J, Li S. Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2010;34(5):501–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.009>
  54. Gao F ying, Qu L, Yu S guo, Ye X, Tian Y yuan, Zhang L li, et al. Identification and expression analysis of three c-type lysozymes in *Oreochromis aureus*. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2012;32(5):779–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.031>
  55. Yu L ping, Sun B guang, Li J, Sun L. Characterization of a c-type lysozyme of *Scophthalmus maximus*: Expression, activity, and antibacterial effect. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2013;34(1):46–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.007>
  56. Agrawal A, Singh PP, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. Pattern recognition by pentraxins. *Adv Exp Med Biol*. 2009;653:98–116.
  57. Nauta AJ, Daha MR, Van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: A role for complement and pentraxins. *Trends Immunol*. 2003;24(3):148–54.
  58. Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2011;35(12):1296–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.003>
  59. Garjani A. Pharmaceutical sciences. *Pharm Sci*. 2016;22(1):1.
  60. Iger Y, Abraham M. Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors. *Tissue Cell*. 1997;29(4):431–8.
  61. Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Børgwald J, Dalmo RA. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2005;19(5 SPEC. ISS.):429–39.
  62. Fan C, Wang J, Zhang X, Song J. Functional C1q is present in the skin mucus of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Integr Zool*. 2015;10(1):102–10.
  63. Shen Y, Zhang J, Xu X, Fu J, Li J. Expression of complement component C7 and involvement in innate immune responses to bacteria in grass carp. *Fish Shellfish*

- Immunol [Internet]. 2012;33(2):448–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.016>
64. Palaksha KJ, Shin GW, Kim YR, Jung TS. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*. 2008;24(4):479–88.
  65. Sanahuja I, Ibarz A. Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2015;46(2):426–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.056>
  66. Gabriella C, Giulia M, Lucrezia G, Rosalba C, Maria Gabriella D, Santi D, et al. Comparative Study of Antibacterial and Haemolytic Activities in Sea Bass, European Eel and Blackspot Seabream. *Open Mar Biol J*. 2014;8(1):10–6.
  67. Gunasekaran G. Antimicrobial properties of skin mucus from four freshwater cultivable Fishes (*Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Labeo rohita* and *Ctenopharyngodon idella*). *African J Microbiol Res*. 2012;6(24):5110–20.
  68. Kumari S, Tyor AK, Bhatnagar A. Evaluation of the antibacterial activity of skin mucus of three carp species. *Int Aquat Res*. 2019;11(3):225–39.
  69. Al-Rasheed A, Handool KO, Garba B, Noordin MM, Bejo SK, Kamal FM, et al. Crude extracts of epidermal mucus and epidermis of climbing perch *Anabas testudineus* and its antibacterial and hemolytic activities. *Egypt J Aquat Res* [Internet]. 2018;44(2):125–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.002>
  70. Subramanian S, Ross NW, Mackinnon SL. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. 2008;150:85–92.
  71. Timalata K, Marimuthu K, Vengkades Rao R, Xavier R, Rahman MA, Sreeramanan S, et al. Elucidation of innate immune components in the epidermal mucus of different freshwater fish species. *Acta Ichthyol Piscat*. 2015;45(3):221–30.
  72. Lee Y, Bilung LM, Sulaiman B, Chong YL. The antibacterial activity of fish skin mucus with various extraction solvents and their in-vitro evaluation methods. *Int Aquat Res*. 2020;12(1):1–21.
  73. Wei OY, Xavier R, Marimuthu K. Screening of antibacterial activity of mucus extract of

- snakehead fish, *Channa striatus* (Bloch). *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010;14(8):675–81.
74. Warren MR, Sun H, Yan Y, Cremer J, Li B, Hwa T. Spatiotemporal establishment of dense bacterial colonies growing on hard agar. *Elife*. 2019;8:1–47.
  75. Ben-david A, Davidson CE. Estimation method for serial dilution experiments. *J Microbiol Methods*. 2014;
  76. Hellio C, Pons AM, Beaupoil C, Bourgougnon N, Gal Y Le. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;20(3):214–9.
  77. Of I, On M, Shephard BYKL. Buckingham, Buckingham,. 1984;449–60.
  78. Zhang Z, Chi H, Dalmo RA. Trained innate immunity of fish is a viable approach in larval aquaculture. *Front Immunol*. 2019;10(JAN):1–5.
  79. Bianchi F, Pretto S, Tagliabue E, Balsari A, Bianchi F, Pretto S, et al. Exploiting poly ( I : C ) to induce cancer cell apoptosis Exploiting poly ( I : C ) to induce cancer cell apoptosis. 2017;4047.
  80. John T, Thomas T, Abel B, Wood BR, Chalmers DK, Martin LL. How kanamycin A interacts with bacterial and mammalian mimetic membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2017;1859(11):2242–52.
  81. Jusko WJ. Ampicillin. *J Am Pharm Assoc*. 1975;15(10):591–4.