

Estudio exploratorio de la presencia de actividad antibacteriana en la sangre de la concha prieta *Anadara similis*

Alberto Fernández¹, Luis Salazar¹, Federico Sinche¹, Renato Recalde¹, Sabrina Gallegos², Alberto Lino³, Angel Ortiz⁴ y Marcelo Muñoz¹

¹ Laboratorio de Biología de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ² Universidad Agraria del Ecuador-Facultad de Economía Agrícola. ³ Centro de Servicios para la Acuicultura. ⁴ Programa de biotecnología de la Universidad Estatal de Guayaquil.

Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Campus “Gustavo Galindo V.”, Km. 30.5, Vía Perimetral, contiguo a la Cdla. Sta. Cecilia, 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador.

nfernand@espol.edu.ec, lsalazar@espol.edu.ec, fsinche@espol.edu.ec, jrrecald@espol.edu.ec, alino@goliat.espol.edu.ec, mmunoz@espol.edu.ec

Resumen

*El presente trabajo describe la presencia mayoritaria de células circulantes en la sangre de la concha prieta y la presencia de actividad antibacteriana en estas células. Las observaciones de microscopía óptica muestran a estas células mayoritarias como un grupo homogéneo con una morfología característica. Las células descritas en este estudio presentan un núcleo bien definido y abundantes estructuras citoplasmáticas similares a gránulos. El presente trabajo también establece la existencia de una cierta actividad antibacteriana de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra 3 cepas bacterianas identificadas como *Bacillus sp.-2*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio anguillarum*. Además, bajo las condiciones de experimentación de este trabajo, se descarta que el origen de estas actividades antibacterianas se encuentre localizado en cualquier célula distinta de las células circulantes de la concha prieta. El presente estudio, es a nuestro conocimiento, la primera descripción de la presencia de actividad antibacteriana en el molusco *Anadara similis*.*

Palabras Claves: *Invertebrados, anadara, actividad antibacteriana, inmunidad.*

Abstract

*The present study describes the highly circulating cells presence on concha prieta blood and also the presence of antibacterial activity on these cells. The observations in optical microscopy highly showed to these cells as a homogeneous group with characteristic morphology. Cells described on this study implied a well defined nucleus and plenty cytoplasmatic structures similar to granules. The present research also establish the existance of certain antibacterial activity of the plainned concha prieta circulating cells against three batches identified as *Bacillus sp.-2*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio anguillarum*. Likewise, under experimental conditions on this research, it has been discarded that the origin of this antibacterial activities are located in every different cell of the concha prieta circulating ones. This research is to our point of view, the primary description of the antibacterial activity presence in the mollusk *Anadara similis*.*

1. Introducción

En los invertebrados en general, la carencia de respuesta inmune basada en anticuerpos supone un importante rol para otros mecanismos inmunitarios [1]. Estudios realizados tanto en artrópodos como moluscos han permitido identificar algunos elementos que forman parte de la respuesta inmunitaria de estos organismos [2]. Esta inmunidad se encuentra asociada con reacciones celulares y compuestos de naturaleza orgánica presentes en la

hemolinfa. Estos componentes son sintetizados por los distintos tejidos del cuerpo siendo liberados posteriormente en la hemolinfa o en forma local, en respuesta a un estímulo de tipo infeccioso [3] y [2].

En algunos moluscos de importancia comercial como el mejillón y la ostra, en los cuales se ha profundizado el estudio de la respuesta inmune, ciertos componentes de esta han sido identificados. En el mejillón, algunas proteínas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana han sido caracterizadas [4]. En lo que concierne a las ostras,

algunos efectores de la respuesta inmune fueron identificados utilizando la metodología de las Secuencias de Expresión Marcadas (EST). Así, transcritos de moléculas, con una probable función inmunitaria, han sido puestos en evidencia [2].

En otros moluscos de menor importancia económica, poca información existe en lo concerniente a su inmunidad, tal es el caso de la concha prieta. Sin embargo, en un organismo filogenéticamente relacionado con la concha prieta, como la *Anadara granosa*, moléculas de tipo lectina han sido identificadas y caracterizadas [3]. Este hecho fundamenta que organismos del género *Anadara* poseen particularidades inmunitarias aún no descritas. En este sentido, el presente trabajo es una primera contribución, orientada hacia una descripción preliminar de particularidades morfológicas y funcionales de la concha prieta.

2. Materiales y métodos

2.1. Material biológico

Las conchas fueron compradas en los mercados locales, los moluscos presentaban entre 4 y 6 cm de longitud. La hemolinfa fue obtenida utilizando la Solución Modificada de Alsever (MAS) o citrato de sodio al 10% pH 7.2 con jeringuillas de 5 ml y agujas de 23 1G. Las muestras obtenidas con MAS fueron usadas para la separación de células en gradientes de percoll. Las muestras extraídas con citrato de sodio fueron usadas para la preparación de frotis y ensayos de actividad antibacteriana.

Los microorganismos de prueba para los ensayos de actividad antibacteriana, fueron cepas identificadas como: *Bacillus sp.* (1), *Bacillus sp.* (2), *Bacillus sp.* (3), *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus* y *Escherichia coli* D31, gentilmente donados por el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA) y el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano" (CENAIM).

2.2 Separación de células mediante centrifugación iso-pícnica

Percoll (Sigma) fue utilizado para preparar series diluidas de este (10, 20, 30, 40, 50 y 60 %) en Solución de Sales Balanceadas de Hanks (HBSS) v/v. Los gradientes de densidad discontinuos fueron realizados utilizando 2 ml de cada concentración de percoll diluido. Las muestras (6 ml de suspensión de células) fueron depositadas sobre el gradiente de percoll. Los tubos fueron centrifugados a 15 g por 40 minutos a temperatura ambiente.

2.3 Frotis y Tinción

Las células fueron fijadas al portaobjetos a través de la preparación de frotis usando la técnica del esparcimiento en placa. Finalmente, las células fueron teñidas con la tinción de Wright y observadas al microscopio óptico (Motic, B1 series).

2.4 Domesticación de cepas bacterianas para su uso en los ensayos de inhibición

Antes de proceder a los análisis turbidométricos, se estableció el número de UFC/ml equivalente a la densidad óptica, para cada una de las cepas analizadas. Así, se realizaron los cultivos en medio líquido (Lennox broth), de los diferentes microorganismos usados para los distintos ensayos.

Luego de 24 horas de crecimiento de los microorganismos, se realizó la lectura en un espectrofotómetro y se obtuvo un valor respectivo de turbidez.

En paralelo, se realizó por duplicado el cultivo en medio sólido de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} de cada una de las cepas bacterianas utilizadas en estos ensayos luego de 24 horas de crecimiento. Las diluciones de los microorganismos fueron realizadas con una solución de NaCl al 0.25 %. Las bacterias fueron cultivadas por el método de siembra en profundidad, utilizando el medio sólido de Lennox suplementado con agar (1.25 %). Los conteos de UFC fueron realizados 24 horas después del inóculo para todas las cepas de vibrio, excepto *V. anguillarum* y todas las cepas de bacillus. El conteo de UFC de todas las cepas bacterianas, que no crecieron hasta las 24 horas, fue realizado 48 horas después la siembra. Estas cepas demostraron crecimiento lento en medio sólido.

Utilizando el mismo procedimiento, se estimó también el número de UFC/ml para la cepa *E. Coli* D31, como un control interno de experimentación. Esta última cepa tiene un valor estándar establecido de $1.2 * 10^9$ cél/ml correspondiente a una absorbancia de 1.

2.5 Ensayos de actividad antimicrobiana por halos de inhibición

Tubos conteniendo un volumen de 15-20 ml de Lennox agar, fueron mantenidos en baño maría a 45°C, para evitar su solidificación. En cada uno de estos fueron inoculadas $2 * 10^6$ bacterias, para inmediatamente ser depositadas y homogenizadas en cajas petri, asegurando de esta manera el crecimiento bacteriano en todo el volumen del medio. Una vez

solidificado el medio de cultivo, fueron realizadas 5 perforaciones circulares de 0.6 cm de diámetro, con una pipeta Pasteur estéril. El agar perforado fue eliminado, dejando un orificio circular (hoyo) en el medio sólido. Luego, fueron depositados en los hoyos de cada una de las cajas, 30 µl de muestra (plasma). Los 2 pozos restantes consisten en un control de crecimiento bacteriano, en donde fue adicionado en el hoyo, solución salina estéril y un control de inhibición del crecimiento de las bacterias, compuesto por una solución de etilendiamino tetraácido-acético (EDTA) al 5%. Las cajas fueron incubadas por más de 16 horas, en donde los vibrios y bacillus fueron incubados a temperatura ambiente y la *E. coli* D31 a 37°C. El tiempo para la detección de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, alrededor de los pozos, dependió de la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas.

2.6 Ensayo turbidométrico

En lo que concierne a la muestra, una vez tomado el líquido que contiene las células circulantes, este fue centrifugado a 785 g o 17092 g, durante 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y filtrado, filtros de 0.2 µm (millipore), este filtrado fue luego utilizado para los ensayos de inhibición. Se tomó como guía para los ensayos turbidométricos, el método realizado por Tapia en 1997 [5], utilizando una variante en el protocolo original en lo que Así, las bacterias fueron diluidas en tampón Hepes 0.1 M a pH 7 como esta descrito Lijima *et al.* 2003. [6]. El ensayo turbidométrico consistió en la adición de la muestra de muestra de prueba (sobrenadante de lisado de células), las bacterias y el medio de cultivo líquido (Lennox broth). En paralelo se realizó un control positivo, un control negativo y un control de efecto de inhibición. El control positivo se lleva a cabo colocando bacterias y el medio de cultivo. El control negativo incluyó una muestra de sobrenadante de lisado de las células y el medio de cultivo. Los controles de inhibición fueron realizados utilizando una solución de EDTA (1 % y 5 %), bacterias y medio de cultivo. Cada uno de los análisis de prueba y controles fueron realizados por triplicado. A fin de estimar la capacidad de inhibición de los distintos tratamientos, los resultados son presentados como porcentaje de inhibición de la muestra para cada una de las cepas, el valor del porcentaje de inhibición fue obtenido usando la fórmula:

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

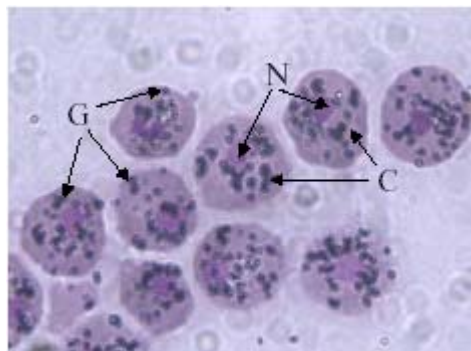
3. Resultados

El examen inicial del fluido presente en la concha prieta, muestra un importante componente celular en dicho elemento. Ensayos de decantación mostraron que más del 40% del volumen de este fluido, estaba compuesto por células, dato que fue confirmado luego de centrifugación a 15 g.

Las características generales de estas células fueron puestas en evidencia utilizando microscopía óptica. Las observaciones fueron desarrolladas usando el lente de inmersión en frotis en fresco teñidos con tinción de Wrigth. Las observaciones de estos frotis demostraron la presencia predominante de células con un citoplasma y núcleo (Fig. 1). El núcleo de las células observadas demostró ser bien definido y de naturaleza basófila. El citoplasma de estas células presentó la tinción eosinófila característica de este compartimiento celular, en donde se puede diferenciar elementos esféricos oscuros, distribuidos alrededor de todo el citoplasma. Estos elementos esféricos tienen una coloración café-amarillenta al ser observados en fresco con un microscopio óptico. Estas estructuras tienen aspecto de gránulos y presentan un movimiento continuo.

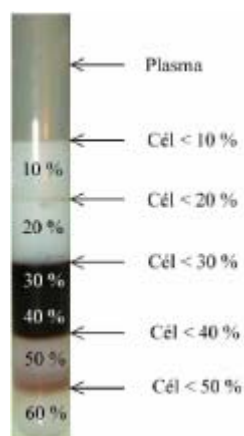
Con el fin de separar las células circulantes de la concha prieta, muestras de células circulantes fueron sometidas a gradientes discontinuos de percoll, para diferenciarlas de acuerdo a su densidad. La separación isopícnica de las células circulantes de la concha, demostró que la mayor parte de estas células migraron hasta la fracción comprendida con una densidad de percoll de 30-40% (Fig. 2). Un número menor de células, fueron observadas en las fracciones de 10-20% y 40- 50% respectivamente (Fig. 2).

Figura 1. Células circulantes de la concha prieta, C: citoplasma, N: núcleo, G: elementos esféricos oscuros.



En lo que concierne a la evaluación de la actividad antimicrobiana, antes de realizar los análisis por halo de inhibición y turbidométricos, fue necesario establecer la equivalencia entre la absorbancia y el número de bacterias correspondientes por espectrofotometría. Así, se estableció que el valor de absorbancia de 1, corresponde aproximadamente a una densidad de 1.7×10^8 de células/ml de *Bacillus sp.* (1), 1.1×10^8 de células/ml de *Bacillus sp.* (2), 6.9×10^8 de cél/ml de *Bacillus sp.* (3), 1.9×10^8 de cél/ml de *V. harveyi*, 3.6×10^9 de cél/ml de *V. alginolyticus* y 2.8×10^9 de cél/ml de *V. anguillarum*, 7.2×10^8 de cél/ml de *V. vulnificus* y 1.16×10^9 de cél/ml de *E. coli* (D31). Establecida la relación entre la absorbancia y el número aproximado de cél/ml para cada cepas se procedió a los análisis de actividad antimicrobiana.

Figura 2. Separación de células circulantes por gradiente isopícnico de Percoll.



Los resultados por halo de inhibición, no demostraron ninguna actividad del fluido extraído, en ausencia de las células circulantes sobre todas las cepas analizadas en nuestros ensayos. Así, se descartó la utilización de estas muestras para los análisis turbidométricos. En esta forma, los ensayos turbidométricos fueron realizados utilizando el sobrenadante del producto de la lisis mecánica de las células circulantes de la concha prieta por centrifugación a 785 g y 17092 g. Los lisados de las células circulantes, tanto a 785 como 17092 g, no presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas denominadas *Bacillus sp.*-1, *Bacillus sp.*-3. Sin embargo, el crecimiento de la cepa identificada *Bacillus sp.*-2 fue inhibido en un 43% y 33% por los sobrenadantes de los lisados a 17092g y 785g respectivamente (Tablas: 1, 2 y 3).

Además, no se observó inhibición del crecimiento de las cepas de *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*, inducida por ninguno de los lisados celulares

utilizados en los ensayos realizados (Tablas 4 y 5, respectivamente). Sin embargo, se determinó un potente efecto de inhibición de crecimiento de la cepa *V. harveyi*, provocado por los lisados de las células de la concha prieta. El efecto reportado en este trabajo, alcanza valores de 99% de inhibición para la muestra centrifugada a 17092 g y 98% de inhibición para la muestra centrifugada a 785 g (Tabla 6). Además, se estableció un efecto inhibitorio de los lisados celulares sobre la cepa *V. anguillarum*. Los valores de inhibición fueron de 45% y 30% de inhibición del crecimiento bacteriano para los lisados obtenidos a 17092 g y 785 g respectivamente. (Tabla 7).

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento antibacteriano de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra: *Bacillus sp.* -1.

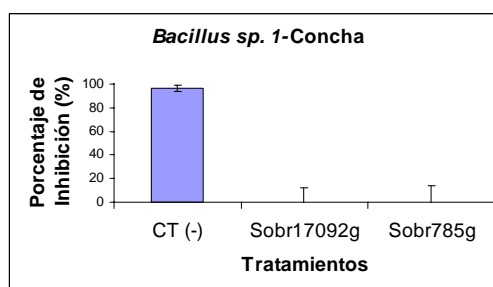


Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento antibacteriano de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra: *Bacillus sp.* -2.

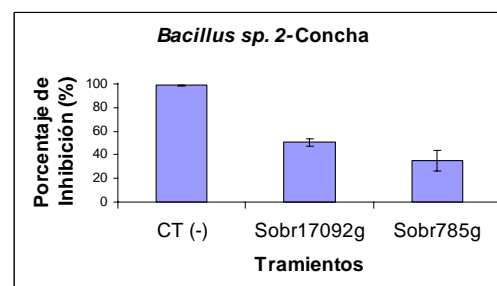


Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento antibacteriano de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra: *Bacillus sp.* -3.

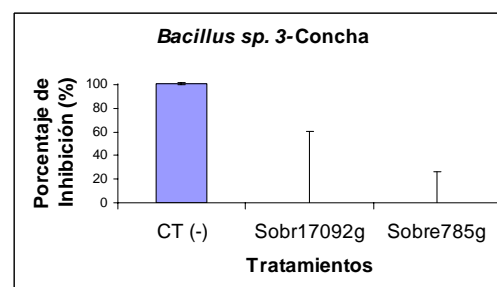


Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento antibacteriano de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra: *V. alginolyticus*.

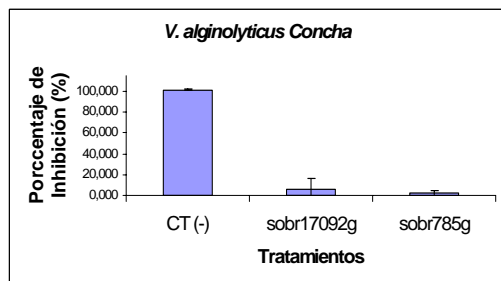


Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento antibacteriano de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra: *V. vulnificus*.

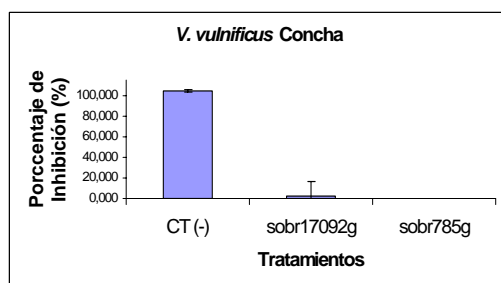


Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento antibacteriano de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra: *V. harveyi*.

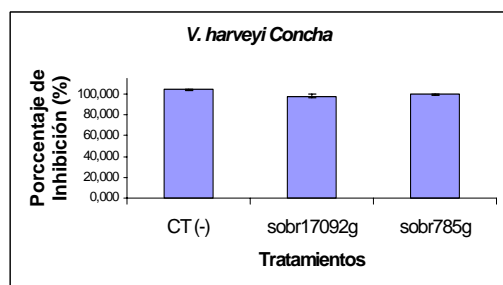
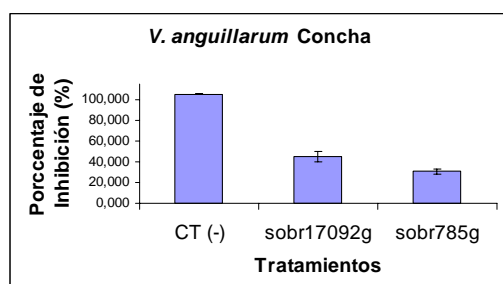


Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento antibacteriano de los lisados de las células circulantes de la concha prieta contra: *V. anguillarum*.



4. Discusión

Las células circulantes de moluscos han sido diferenciadas en 2 categorías: los amebocitos y los eritrocitos. Los eritrocitos han sido encontrados en bivalvos y otros moluscos que poseen hemoglobina [7]. En los bivalvos la presencia de hemoglobina ha sido determinada en la hemolinfa, al interior de los eritrocitos o disuelta en la hemolinfa [8]. Así, cabe destacar que el termino eritrocito utilizado para las células circulantes sanguíneas de algunos moluscos, se encuentra asociado a la presencia de hemoglobina, en estas células. Nuestras observaciones en las células circulantes de la concha prieta, son consecuentes con la presencia de células con un núcleo basófilo y de abundantes estructuras de color café-amarillento, dispersas en el citoplasma, con movimiento browniano, las cuales poseen características similares a los eritrocitos de ciertos moluscos [9].

Los resultados obtenidos luego de la separación isopícnica en percoll, son consistentes con la presencia de un grupo predominante de células circulantes de tipo eritrocito en la concha prieta. Este grupo predominante, fue localizado en las fracciones diluidas de percoll entre 30-40%, luego de centrifugación isopícnica. Así, nuestro estudio nos permite determinar una población mayoritaria de células de acuerdo a su densidad, que presenta características morfológicas similares a la de los eritrocitos de otros moluscos. En este sentido, mucho trabajo resta por realizar a nivel de ultraestructura de estas células, para esclarecer estas observaciones realizadas al microscopio óptico.

En lo que concierne a la actividad antibacteriana, nuestros resultados sugieren que cualquiera que sea el o los principios responsables de las actividades antibacterianas identificadas bajo nuestras condiciones experimentales, tienen su origen en el interior de las células. Esta apreciación se fundamenta, en la ausencia de actividad antibacteriana del líquido extracelular en donde las células fueron recuperadas. Sin embargo, se determinó la inhibición del crecimiento bacteriano inducido por los lisados de las células circulantes, mediante análisis turbidométricos sobre 2 cepas Gram (-) y una cepa de bacterias Gram (+). Esta particularidad, es consistente con las descripciones de la localización de efectores antimicrobianos, efectuada en mejillón en donde factores antimicrobianos han sido co-localizados en el interior de sus gránulos citoplasmáticos [4] y [9].

Así, información disponible sobre otros moluscos nos permitiría sugerir la hipótesis que los gránulos presentes en las células circulantes de la concha

prieta, podrían almacenar algún tipo de efector o efectores que posean actividad antibacteriana.

En nuestros ensayos logramos establecer que los lisados de células circulantes tienen un efecto de inhibición del crecimiento, contra las cepas identificadas como *V. harveyi* y *V. anguillarum*, ambas bacterias Gram (-), y la cepa Gram (+) identificada como *Bacillus sp-2*. Este hecho determina un cierto grado de especificidad y/o mayor eficiencia de inhibición del o los factores responsables de esta actividad antibacteriana contra determinadas cepas. Sin embargo, la actual información disponible, no nos permite inferir la importancia fisiológica de esta especificidad de las actividades antibacterianas detectadas.

Nuestras observaciones nos permitan afirmar la presencia de actividad antimicrobiana contra un grupo de cepas bacterianas, pero no nos permiten afirmar que los lisados no tengan actividad contra las otras cepas que nuestros ensayos no lograron poner en evidencia. Este particular, se encuentra principalmente asociado a nuestras condiciones de trabajo, donde solo utilizamos un extracto crudo de lisados de las células circulantes. Este hecho, no nos permite descartar, algún efecto de enmascaramiento de la actividad entre moléculas o que la concentración del o los principios activos no haya sido suficiente como para inducir la inhibición del crecimiento antibacteriano. Además, debido al origen de las conchas prietas utilizadas en nuestros ensayos no podemos inferir el efecto de la variabilidad entre los individuos sobre nuestros resultados.

Sin embargo, la información bibliográfica a nuestra disposición, es consistente con la presencia de moléculas con efecto antibacteriano en otros moluscos e invertebrados. Este es el caso de algunos moluscos, en donde han sido caracterizadas moléculas tipo lectina [3]. En los moluscos también se ha demostrado la presencia de una serie de moléculas tipo aglutininas [2] y [3]. A pesar de esta particularidad, no podemos descartar otras aproximaciones que puedan explicar la actividad antimicrobiana de las células circulantes de la concha prieta. Así, en otros invertebrados como la esponja *Dendrilla nigra*, productos metabólicos secundarios parecen limitar el crecimiento de algunas cepas de vibrio [10]. Además, tampoco se puede desestimar la implicación de péptidos antimicrobianos en la actividad antibacteriana detectada. Este hipótesis se encuentra sustentada en estudios realizados en mejillones, donde ciertos péptidos antimicrobianos han sido caracterizados en estos moluscos [4] y [9]. No obstante, estas informaciones bibliográficas, no son más que indicios para futuros trabajos que podrían dilucidar la presencia de moléculas u otros

productos celulares intermediarios con propiedades fisiológicas antibacterianas en la concha prieta.

5. Conclusión

El estudio realizado demuestra la presencia de una población mayoritaria morfológicamente homogénea en los fluidos celulares de la concha prieta. Este estudio, también pone de manifiesto la presencia de actividades antibacterianas en las células circulantes de este molusco. La información descrita en este trabajo abre nuevas perspectivas de estudio y aplicación de un recurso natural del litoral ecuatoriano que tiene un valor económico y social para algunas comunidades de esta región del país.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al Decano de la FIMCM, Ing. Eduardo Cervantes, por las facilidades prestadas para el desarrollo de este estudio. Los autores también desean agradecer, en forma especial, al M.Sc. César Bedoya, M.Sc. Ecuador Marcillo y M.Sc. Jerry Landívar, por su valiosa ayuda en la discusión, crítica y redacción del presente texto. Los autores agradecen al CENAIM por su colaboración, para realizar los gradientes isopícnicos y la donación de cepas bacterianas. Los autores desean agradecer particularmente al CSA y a su personal, por prestar sus instalaciones para la realización de algunos ensayos de este trabajo y la donación de cepas para el presente estudio. Este estudio ha sido cofinanciado como proyecto semilla por el CICYT y la FIMCM

7. Bibliografía

- [1] Loker E., Adema C., Zhang Si-ming, Kepler T. Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198, 2004, pp. 10-24.
- [2] Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., De Lorgeril J., Garnier J., Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimp and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 198, 2004, pp. 149-168.
- [3] Yakoovleva N.V., Samoilovich M. P., and Gorbushin A. M. The diversity of strategies of defense from pathogens in Mollusc, *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 37, No. 4, 2001, pp. 358-367.
- [4] Mita G. F. Vandenbulcke, T. Noel, B. Romestand, J.C. Beauvillain, M. Salzet and P. Roch. Differential distribution and defence

- involvement of antimicrobial peptides in mussel, *Journal of Cell Science*, 2000, No. 113, pp. 2759-2769.
- [5] Tapia F. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor. Escuela Superior Politécnica del litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 1997.
- [6] Lijima N., Tanimoto N., Emoto Y., Morita Y., Uematsu K., Murakami T., Nakai T. Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophryx major*. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2003, pp. 675-686.
- [7] Hill R., and Welsh J. Heart, circulation, and blood cells. *Physiology of Mollusca*, Edited by Wilburg K and Yonge C. NEW York, Academic Press, Inc., 1966, pp. 125-174.
- [8] Read k.. Molluscan hemoglobin and Myoglobin *Physiology of Mollusca*, Edited by Wilburg K and Yonge C. NEW York, Academic Press, Inc., 1966, pp. 209-232.
- [9] Mitta G., Vandenbulcke F, Hubert F., Roch P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense, *Journal of Biological Biochemistry*. 2000, No. 275, pp.12954-12962.
- [10] Selvin J., Lipton A. *Dendrilla nigra*, a marine sponge, as potential source of antibacterial substances for managing shrimp diseases. *Aquaculture*, 236, 2004, pp. 277-283.