



ORIGINAL

## Aislamiento de cepas de *Enterococcus hirae* productoras de enterocinas a partir del contenido intestinal de mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*)



Marisol Vallejo<sup>a</sup>, Romina B. Parada<sup>a,b</sup> y Emilio R. Marguet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut, Argentina

<sup>b</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), República Argentina

Recibido el 5 de junio de 2018; aceptado el 1 de junio de 2019

Disponible en Internet el 15 de julio de 2019

### PALABRAS CLAVE

*Enterococcus hirae*;  
Mejillón patagónico;  
Enterocinas

**Resumen** Se aislaron del contenido intestinal del mejillón patagónico dos cepas de bacterias ácido lácticas y se caracterizaron por pruebas fenotípicas y moleculares. Los aislamientos se identificaron como *Enterococcus hirae* y fueron denominados *E. hirae* 463Me y 471Me. Por técnicas de PCR se identificó el gen de la enterocina P en ambas cepas, mientras que solamente en la cepa 471Me se detectó la enterocina hiracin JM79. Ambas cepas resultaron sensibles a los antibióticos clínicamente importantes y entre los rasgos de virulencia investigados mediante amplificación por PCR solo se pudieron detectar los genes *cyLL<sub>I</sub>* y *cyLL<sub>S</sub>*, sin embargo, no se observó actividad hemolítica en la prueba de agar sangre. Los sobrenadantes libres de células resultaron activos contra todas las cepas de *Listeria* y *Enterococcus* ensayadas, contra *Lactobacillus plantarum* TwLb 5 y contra *Vibrio anguillarum* V10. En óptimas condiciones de crecimiento, ambas cepas mostraron actividad inhibitoria contra *Listeria innocua* ATCC 33090 después de 2 h de incubación. *E. hirae* 471Me alcanzó una actividad inhibitoria máxima de 163.840 UA/ml después de 6 h de incubación, mientras que el mismo valor se registró para *E. hirae* 463Me después de 8 h. En ambos casos, la actividad antagonista alcanzó su máximo antes de lograr la fase estacionaria y permaneció estable hasta las 24 h de incubación. En nuestro conocimiento, este es el primer informe de aislamiento de cepas bacteriocinogénicas de *E. hirae* de mejillón patagónico. La alta actividad inhibitoria y la ausencia de rasgos de virulencia indican que estos microorganismos podrían aplicarse en áreas biotecnológicas como la biopreservación de alimentos o las formulaciones probióticas.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [emarguet@yahoo.com.ar](mailto:emarguet@yahoo.com.ar) (E.R. Marguet).

**KEYWORDS**

*Enterococcus hirae*;  
Patagonian mussel;  
Enterocins

**Isolation of enterocin-producing *Enterococcus hirae* strains from the intestinal content of the Patagonian mussel (*Mytilus edulis platensis*)**

**Abstract** Two bacteriocin-producing lactic acid bacterial strains were isolated from the intestinal content of the Patagonian mussel and characterized by phenotypic and molecular tests. The isolates were identified as *Enterococcus hirae* and named *E. hirae* 463Me and 471Me. The presence of the enterocin P gene was identified in both strains by PCR techniques, while enterocin hiracin JM79 was detected only in the 471Me strain. Both strains were sensitive to clinically important antibiotics and among the virulence traits investigated by PCR amplification, only *cyLL<sub>1</sub>* and *cyLL<sub>5</sub>* could be detected; however, no hemolytic activity was observed in the blood agar test. Cell free supernatants were active against all *Listeria* and *Enterococcus* strains tested, *Lactobacillus plantarum* TwLb 5 and *Vibrio anguillarum* V10. Under optimal growth conditions, both strains displayed inhibitory activity against *Listeria innocua* ATCC 33090 after 2 h of incubation. *E. hirae* 471Me achieved a maximum activity of 163 840 AU/ml after 6 h of incubation, while the same value was recorded for *E. hirae* 463Me after 8 h. In both cases, the antagonist activity reached its maximum before the growth achieved the stationary phase and remained stable up to 24 h of incubation. To our knowledge, this is first report of the isolation of bacteriocinogenic *E. hirae* strains from the Patagonian mussel. The high inhibitory activity and the absence of virulence traits indicate that they could be applied in different biotechnological areas such as food biopreservation or probiotic formulations.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introducción**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de microorganismos gram positivos, no esporulados, catalasa y oxidasa negativos, aerotolerantes, que producen ácido láctico como principal metabolito derivado de la fermentación de azúcares<sup>10</sup>. Las BAL son ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la industria láctea para la fabricación de quesos, yogures y leches cultivadas, y han ganado notoriedad como probióticos, término utilizado para referirse a aquellos microorganismos que componen un suplemento alimentario microbiano vivo que beneficia al huésped animal con una mejoría del balance microbiano intestinal<sup>14</sup>.

Las BAL han sido extensamente estudiadas no solo por sus características biotecnológicas, sino debido a su capacidad de sintetizar bacteriocinas, es decir, péptidos de origen ribosomal que representan un mecanismo de defensa contra grupos bacterianos filogenéticamente relacionados<sup>32</sup>. Se han identificado algunas BAL con actividad contra bacterias gram negativas, sin embargo, se trata de casos aislados<sup>18,32</sup>. Las bacteriocinas pueden ser aplicadas como conservantes naturales para proteger la calidad y la vida útil de alimentos y bebidas. Esta tendencia se ve impulsada por la exigencia cada vez mayor de los consumidores, que requieren alimentos exentos de conservantes químicos y con nuevas propiedades benéficas para la salud, más allá de la nutrición básica<sup>24,29</sup>.

Existen numerosos estudios que demuestran los beneficios del uso de bacteriocinas para la conservación de alimentos. Sin embargo, en la actualidad solo la nisina y la pediocina PA-1 son permitidas como aditivos en la industria alimentaria<sup>29</sup>.

Durante las últimas décadas ha aumentado en forma exponencial el número de investigaciones dirigidas al

aislamiento de cepas de BAL bacteriocinogénicas y a la purificación de nuevas bacteriocinas a partir de alimentos fermentados obtenidos en hábitats terrestres<sup>9,21</sup>. En forma contraria, las iniciativas para lograr el aislamiento de microorganismos de hábitats acuáticos o marinos con potenciales aplicaciones biotecnológicas son realmente escasas<sup>16</sup>.

Una de las posibles causas de este fenómeno es la presunción de la baja probabilidad de desarrollo de BAL en medios acuáticos debido a sus altos requerimientos nutricionales. Sin embargo, aún en bajo número pero con frecuencia creciente, comienzan a conocerse comunicaciones no solo del aislamiento de BAL de medios acuáticos, sino de su potencial aplicación en conservación de alimentos o como probióticos, gracias a sus características bioquímicas particulares<sup>9,17</sup>.

En la última década se han reportado aislamientos de BAL bacteriocinogénicas de peces, moluscos, bivalvos, crustáceos y alimentos derivados de productos del mar<sup>7,22,43</sup>; algunas de estas cepas han sido aplicadas con éxito en modelos de control de flora deteriorante o contaminante y contra microorganismos patógenos comunes en acuicultura<sup>7,33,34</sup>.

Se ha planteado, como estrategia general, el aislamiento de cepas de hábitats que ejercen una presión selectiva en virtud de sus condiciones de temperatura, salinidad o baja disponibilidad de nutrientes, porque estas resultarían más eficientes como biopreservadoras de alimentos o probióticos en acuicultura.

En nuestro país son escasos los grupos de investigación dedicados al estudio de BAL provenientes del medio marino; sin embargo, las publicaciones referidas a las cepas aisladas demuestran que estas exhiben un gran potencial desde el punto de vista biotecnológico. En el litoral marítimo de la provincia del Chubut se han logrado aislar del contenido intestinal de distintas especies nativas cepas de los géneros

*Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* con capacidad de sintetizar metabolitos antimicrobianos<sup>31,37,39,44</sup>.

En este trabajo se exhiben los resultados de las pruebas fenotípicas y genotípicas efectuadas en dos cepas de *Enterococcus hirae* bacteriocinogénicas aisladas de mejillones de la costa marítima de la provincia del Chubut. Se incluyen también los resultados de su actividad antimicrobiana contra bacterias contaminantes o deteriorantes de alimentos y contra patógenos comunes en acuicultura.

## Materiales y métodos

### Origen e identificación de los microorganismos

Las cepas de *E. hirae* 463Me y 471Me se obtuvieron de la colección perteneciente al Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Sede Trelew - Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina). Ambas cepas habían sido aisladas del contenido intestinal del mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*) utilizando como medio selectivo el caldo púrpura de bromocresol azida (Merck, Alemania), con posterior repique a agar bilis esculina (Merck, Alemania), hasta obtener cultivos puros. Las cepas se conservaron en caldo tripteína soya (TS, Britania, Argentina) suplementado con glicerol al 10% a  $-30^{\circ}\text{C}$  y se reactivaron mediante sucesivos cultivos en caldo y en agar de Man, Rogosa y Sharp (MRS, Biokar, Francia).

La identificación fenotípica se realizó mediante pruebas bioquímicas y de fermentación de azúcares, según las recomendaciones de Manero y Blanch<sup>27</sup>.

### Determinación de factores de virulencia

#### Actividad de la gelatinasa

Se evaluó en TSA suplementado con 0,8% (m/v) de gelatina. La placa se incubó durante 48 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y se reveló con una solución de ácido tricloroacético al 20% (v/v). La aparición

de zonas claras alrededor de los puntos de siembra se consideró un resultado positivo<sup>25</sup>.

#### Actividad hemolítica

La producción de hemolisinas se evaluó en agar cerebrocorazón (Biokar, Francia) suplementado con sangre desfibrinada de conejo al 5%, luego de una incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completa alrededor de las colonias ( $\beta$ -hemólisis)<sup>38</sup>.

#### Sensibilidad a antibióticos

Se determinó mediante la prueba de difusión en disco en agar Mueller-Hinton (Britania, Argentina) por el método de Bauer et al.<sup>4</sup>. Se utilizaron los siguientes discos de sensibilidad a los antibióticos (Laboratorios Britania, Argentina): ampicilina (10  $\mu\text{g}$ ), amoxicilina-clavulánico (20/10  $\mu\text{g}$ ), cefalotina (30  $\mu\text{g}$ ), eritromicina (15  $\mu\text{g}$ ), rifampicina (5  $\mu\text{g}$ ), trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75  $\mu\text{g}$ ) y vancomicina (30  $\mu\text{g}$ ). Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se utilizaron como microorganismos de control de calidad. Luego de la incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento y los aislamientos de interés fueron categorizados como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R), de acuerdo a las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>8</sup>.

#### Detección de factores de virulencia mediante PCR

Las cepas de *E. hirae* se incubaron en caldo MRS a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 18 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 12.000g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y el ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante reacciones

**Tabla 1** Determinantes genéticos de factores de virulencia investigados por PCR en aislamientos de *Enterococcus hirae* obtenidos de mejillón patagónico

Factor de virulencia	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)	Referencia
Agg	f: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC r: AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	Eaton y Gasson <sup>12</sup>
GelE	f: ACCCCGTATCATTGGTTT r: ACGCATTGCTTTCCATC	419	Eaton y Gasson <sup>12</sup>
Esp	f: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC r: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	Eaton y Gasson <sup>12</sup>
HylEfm	f: GAGTAGAGGAATATCTTAGC r: AGGCTCCAATTCTGT	661	Rice et al. <sup>35</sup>
IS16	f: CATGTTCCACGAACCAGAG r: TCAAAAAGTGGGCTTGGC	547	Werner et al. <sup>45</sup>
CyLL <sub>1</sub>	f: GATGGAGGGTAAGAATTATGG r: GCTTACCTCACTAAGTTTTATAG	253	Semedo et al. <sup>38</sup>
CyLL <sub>5</sub>	f: GAAGCACAGTGCTAAATA AGG r: GTATAAGAGGGCTAGTTTCAC	240	Semedo et al. <sup>38</sup>

Agg: proteína de agregación; GelE: gelatinasa; Esp: proteína de superficie; HylEfm: hialuronidasa; IS16: elemento de inserción; cyLL<sub>1</sub>/L<sub>5</sub>: citolisinas.

de PCR se amplificaron los genes *agg* (proteína de agregación), *gelE* (gelatinasa), *esp* (proteína de superficie), *hylEfm* (hialuronidasa), *IS16* (elemento de inserción) y *cyLL<sub>i</sub>/L<sub>s</sub>* (citolisinas) utilizando los cebadores y las condiciones propuestas por los autores que se indican en la [tabla 1](#).

### Identificación genética

Se realizó la amplificación por PCR empleando cebadores específicos para especie (HI1 5'-CTTTCTGATATGGATGCTGCT-3' y HI2 5'-TAAATTCCTTAAATGTTG-3'), en las condiciones descritas por Jackson et al.<sup>23</sup>, y los cebadores específicos para género *rrs* (5'-CTTTGGATTAGATACCTGGTAGTCC-3' y 5'-TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC-3'), según las sugerencias de Kariyama et al.<sup>26</sup>. Ambas reacciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, EE. UU.). En el caso de las cepas en estudio se realizó una PCR multiplex con ambos pares de cebadores<sup>26</sup>. Como control positivo de los cebadores específicos para género y especie se amplificó el material genético de las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. hirae* F6 (N.º de acceso GenBank: FJ892740), respectivamente.

### Actividad inhibitoria del sobrenadante

La actividad antibacteriana se determinó luego de cultivar las cepas en caldo MRS a 30 °C durante 18-20 h. Terminado el período de incubación, los cultivos se centrifugaron en refrigeración (4 °C) a 8.000 g durante 5 min. El sobrenadante libre de células (SLC) se ajustó a pH 6,8-7 con NaOH 0,5 M (Anedra, Argentina) y se sometió a un calentamiento a 100 °C durante 5 min. Posteriormente, los SLC se filtraron utilizando membranas Sartorius de 0,22 µm de diámetro de poro (Sartorius, Alemania) y se almacenaron a -30 °C hasta la realización de los ensayos. La actividad de los SLC contra *Listeria innocua* ATCC 33090 se determinó por el método de difusión en placa, según lo descrito por Vallejo et al.<sup>44</sup>. Con el propósito de evaluar el espectro de inhibición de las cepas *E. hirae* 463Me y 471Me, se utilizaron los microorganismos indicadores en las condiciones de crecimiento mencionadas en la [tabla 2](#).

### Detección de genes estructurales de enterocinas

Los cebadores y protocolos utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación de los genes estructurales de las enterocinas A, B, P, LB50A/LB50B, bact 91, bact 31, 1071 A/B, ent Q, hiraicin JM79 y mun KS se mencionan en la [tabla 3](#).

**Tabla 2** Actividad antimicrobiana de aislamientos de *Enterococcus hirae* obtenidos de mejillón patagónico

Cepas indicadoras	Medio de cultivo y temperatura	Actividad antimicrobiana	
		<i>E. hirae</i> 463Me	<i>E. hirae</i> 471Me
<i>Listeria innocua</i> Tw 67	TS, 30 °C	++	+++
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	TS, 30 °C	+	++
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	TS, 35 °C	+	+++
<i>L. monocytogenes</i> 1908 <sup>a</sup>	TS, 35 °C	++	+++
<i>L. monocytogenes</i> 1915 <sup>a</sup>	TS, 35 °C	++	++
<i>L. monocytogenes</i> 1599 <sup>a</sup>	TS, 35 °C	++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MRS, 35 °C	+	+
<i>E. faecium</i> Van A	MRS, 35 °C	+	++
<i>E. faecium</i> Van B	MRS, 35 °C	+	++
<i>E. gallinarum</i> Van C1	MRS, 35 °C	+	++
<i>E. casseliflavus</i>	MRS, 35 °C	+	++
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	MRS, 30 °C	—	—
<i>L. garvieae</i> 03/8460 <sup>b</sup>	MRS, 30 °C	—	—
<i>L. garvieae</i> 03/8702 <sup>b</sup>	MRS, 30 °C	—	—
<i>L. piscium</i> 23.3.92 <sup>b</sup>	MRS, 30 °C	—	—
<i>Streptococcus iniae</i> MT 2376 <sup>b</sup>	MRS, 35 °C	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> TwLb 5	MRS, 30 °C	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TS, 35 °C	—	—
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 15307	TS, 30 °C	—	—
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TS, 35 °C	—	—
<i>E. coli</i> ATCC 35218	TS, 35 °C	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	TS, 30 °C	—	—
<i>Yersinia ruckerii</i> 02/1607/C <sup>b</sup>	TS, 25 °C	—	—
<i>Vibrio anguillarum</i> V10 <sup>b</sup>	TS, 25 °C	++	++

Halo de inhibición: +, ≥ 10 mm; ++, ≥ 15 mm; +++, ≥ 20 mm; —, sin inhibición.

<sup>a</sup> Cepas provistas por el Lic. Ledesma (Fac. de Cs. Naturales y Cs. de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco).

<sup>b</sup> Cepas provistas por el Dr. Fernandez-Garayzabal (Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid).

**Tabla 3** Cebadores específicos empleados para detectar en aislamientos de *Enterococcus hirae* obtenidos de mejillón patagónico genes estructurales de enterocinas

Enterocinas	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)	Referencia
Ent A	f: GGTACCACTCATAGTGGAAA r: CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	De Vuyst et al. <sup>11</sup>
Ent B	f: CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG r: AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	De Vuyst et al. <sup>11</sup>
Ent P	f: GCTACGCGTTCATATGGTAAT r: TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87	De Vuyst et al. <sup>11</sup>
Ent LB50A	f: ATGGGAGCAATCGAAAATTA r: TTTGTTAATTGCCCATCCTTC	274	De Vuyst et al. <sup>11</sup>
Ent LB50B	f: ATGGGAGCAATCGAAAATTA r: TAGCCATTTTTCAATTTGATC	274	De Vuyst et al. <sup>11</sup>
Bact 96	f: GTGGAGAGGACGAAAGGAGA r: TTGATTAGTGGAGAGGACGGATTA	291	Henning et al. <sup>21</sup>
Bact 31	f: CCTACGTATTACGGAAATGGT r: GCCATGTTGTACCCAACCATT	130	Özdemir et al. <sup>30</sup>
1071 A/B	f: GGGGAGAGTCGGTTTTTAG r: ATCATATGCGGGTTGTAGCC	273	Martín et al. <sup>28</sup>
EntQ	f: ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA r: TTAACAAGAAATTTTTCCCATGGCAA	105	Belgacem et al. <sup>5</sup>
mun KS	f: TGAGAGAAGGTTAAGTTTTGAAGAA r: TCCACTGAAATCCATGAATGA	379	Zendo et al. <sup>46</sup>
HirJM 79	f: ATGAAAAAGAAAGTATTAACACATTGTGTTATTCTAGG r: ATAAGTTAAGCTTGACTACCTTCTAGGTGCCCATGGACC	408	Almeida et al. <sup>2</sup>

Ent A: enterocina A; Ent B: enterocina B; Ent P: enterocina P; Ent LB50A/50B: enterocina LB50A/B; Bact 96: bacteriocina 96; Bact 31: bacteriocina 31; 1071 A/B: enterocina 1071 A/B; EntQ: enterocina Q; mun KS: mundticina KS; HirJM 79: hiraicina JM 79.

### Curva de crecimiento vs. actividad

Se determinó la curva de crecimiento y la actividad de las bacteriocinas producidas a 35 °C durante 24 h. Se tomaron muestras en forma aséptica para determinar la actividad antimicrobiana y la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro Jenway 6400. La actividad se definió como la recíproca de la dilución más alta que exhibió inhibición completa de *L. innocua* ATCC 33090 y se expresó en unidades arbitrarias (UA) por mililitro de SLC.

### Resultados y discusión

Las dos cepas en estudio se aislaron del contenido intestinal de ejemplares de mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*) capturados en las costas de la ciudad de Comodoro Rivadavia (latitud -45,83; longitud -67,46) y Rada Tilly (latitud -45,92; longitud -67,55, respectivamente). Ambos microorganismos resultaron ser cocos gram positivos, catalasa y oxidasa negativos, que exhibieron crecimiento a 10 °C y a 45 °C, a pH 9,6; en caldo MRS suplementado con NaCl al 6,5% y mostraron actividad de leucina aminopeptidasa y de pirrolidonil arilamidasa.

La identificación fenotípica se completó mediante las pruebas sugeridas por Manero y Blanch<sup>27</sup>, un esquema de reacciones bioquímicas que permite la clasificación de los miembros del género *Enterococcus* a nivel de especie. Ambas cepas fermentaron la arabinosa, el manitol y el metil- $\alpha$ -D glucopiranosido, además presentaron actividad

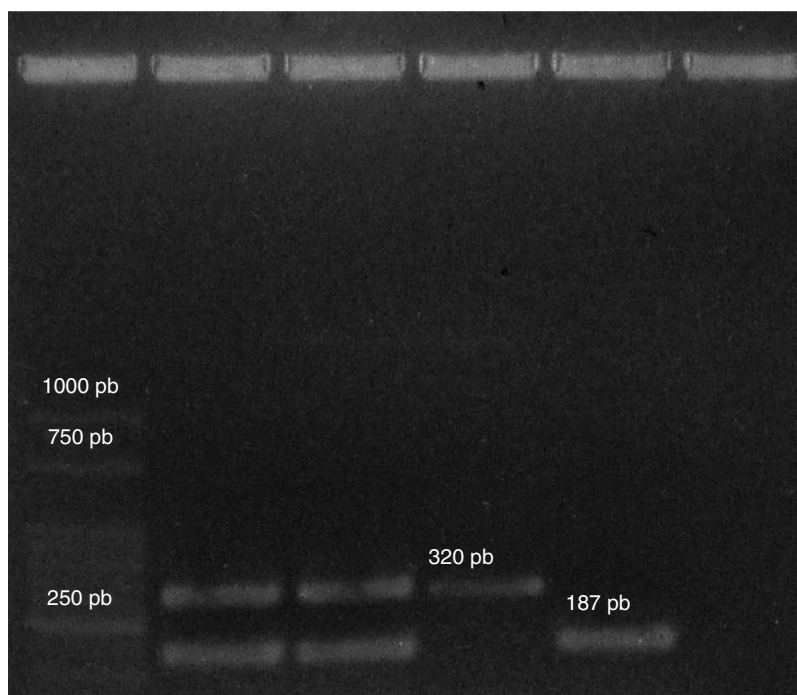
enzimática de arginina deshidrolasa y  $\alpha$ -galactosidasa, reacciones que permitieron clasificarlas como *E. hirae*.

En la figura 1 se pueden observar los productos obtenidos tras la amplificación del material genético por PCR multiplex utilizando los cebadores específicos para género y especie. Se obtuvieron dos bandas, una de aproximadamente 320 pb, en correspondencia con la obtenida con *E. faecalis* ATCC 29212, que fue utilizada como control de género, y la otra de aproximadamente 187 pb, coincidente con la banda obtenida con *E. hirae* F6 (N.º de acceso GenBank: FJ892740), utilizada como control de especie. Los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares descritas permitieron confirmar los obtenidos mediante las pruebas bioquímicas.

*E. hirae* ha sido descrito como patógeno zoonótico, raramente aislado en infecciones humanas. La revisión bibliográfica permite encontrar un número escaso de reportes que señalan el aislamiento de este microorganismo a partir de humanos y, en todos los casos, asociado a la presencia de enfermedades subyacentes<sup>6,40,42</sup>. El primer informe de infección humana causada por *E. hirae* fue publicado por Gilad et al.<sup>15</sup> en 1998; este describía un caso de septicemia en un hombre de 49 años con insuficiencia renal tratada con hemodiálisis.

Las cepas cuyo aislamiento se informa en trabajos previos fueron sensibles a los antibióticos de uso común en la clínica diaria, datos coincidentes con los obtenidos en este estudio. Las dos cepas aisladas del contenido intestinal del mejillón patagónico fueron sensibles a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, trimetoprima-sulfametoxazol, rifampicina y vancomicina (datos no mostrados). La resistencia observada





**Figura 1** Productos de PCR para la identificación de las cepas estudiadas. Calle 1 Marcador molecular, calle 2 *E. hirae* 463Me, calle 3 *E. hirae* 471Me, calle 4 *E. faecalis* ATCC 29212, calle 5 *E. hirae* F6, calle 6 control negativo.

contra cefalotina y eritromicina, por tratarse de microorganismos de origen ambiental, podría ser interpretada como un fenómeno intrínseco, no vinculado con la transmisión de elementos móviles. En el futuro y dado el potencial uso biotecnológico de estas cepas, se deberán realizar estudios complementarios para confirmar la ausencia de genes relacionados con resistencias transmisibles.

La prueba de hemólisis en placa resultó negativa en ambas cepas (datos no mostrados), lo que podría ser contradictorio con los obtenidos por amplificación de los genes *cyLL1* y *cyLLs*, que resultaron positivos en ambos casos. La presencia de uno o más genes es un rasgo ampliamente distribuido dentro del género *Enterococcus*<sup>12</sup>; sin embargo, no es una condición suficiente para lograr la expresión de la toxina. El operón *cyl* está constituido por 6 genes vinculados con la expresión, la maduración, la secreción, la activación y la inmunidad. Las pruebas fenotípicas y la detección de genes *cyl* revelan que la actividad de la toxina está directamente vinculada con la presencia del operón completo<sup>38</sup>. El ensayo en placa continúa siendo la «prueba de oro» para detectar la presencia de la citolisina<sup>38</sup>.

No se obtuvieron productos de amplificación por PCR de los genes *agg* (proteína de agregación), *gelE* (gelatinasa), *esp* (proteína de superficie), *hylefm* (hialuronidasa) e *IS16* (elemento de inserción). No se detectó actividad gelatinasa en la prueba en placa (datos no mostrados), hecho congruente con el de PCR.

El primer reporte de *E. hirae* productor de bacteriocina fue el de Siragusa, en 1992<sup>41</sup>; este investigador aisló una cepa con estas características del intestino bovino. Lamentablemente no hay datos adicionales en este trabajo que describan qué tipo de bacteriocina era la responsable de la actividad antagonista observada. El autor la denominó

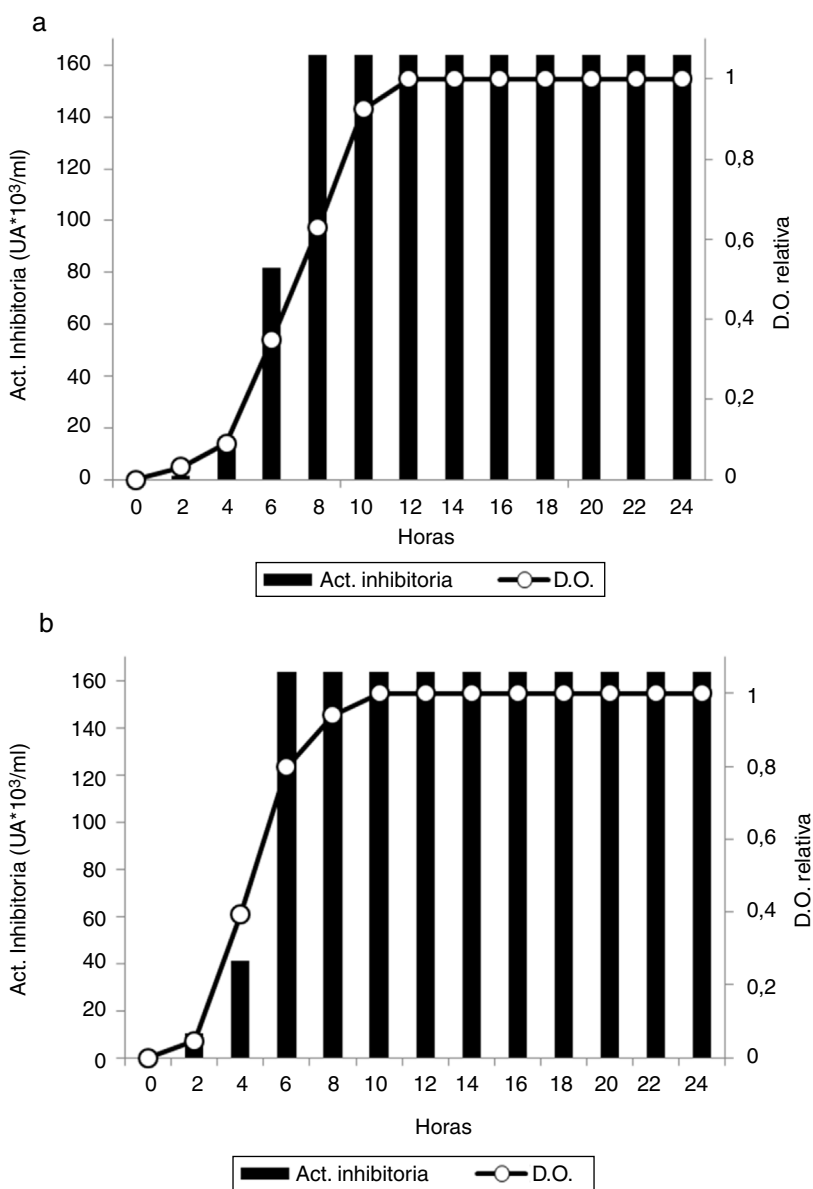
hiraecina S y en el trabajo solo se reportan datos sobre su caracterización fisicoquímica.

En este sentido, en los bancos de datos específicos de bacteriocinas, hasta la fecha hay un solo registro confirmado sobre una cepa de *E. hirae* productora de hiraecina JM79<sup>36</sup>. En 2016, Gupta et al.<sup>19</sup> publicaron un trabajo en donde se sugiere la purificación de una nueva bacteriocina producida por una cepa de *E. hirae* denominada enterocina LD3. Sin embargo, no han sido publicados datos adicionales sobre su secuenciamiento completo o datos genéticos que corroboren dicho hallazgo<sup>19</sup>.

Se han publicado otros trabajos donde se reportan aislamientos de cepas de *E. hirae* bacteriocinogénicas identificadas por técnicas moleculares<sup>1,3,20</sup>, pero no hay precisiones sobre las características del principio activo y, en consecuencia, no es posible realizar afirmaciones concluyentes.

El material genético de las cepas *E. hirae* 463Me y *E. hirae* 471Me se amplificó usando cebadores específicos (tabla 3) a fin de determinar la presencia de genes relacionados con la producción de bacteriocinas. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de los genes estructurales de la enterocina P y de la hiraecina JM79 en la cepa 471Me y solo del gen de la enterocina P en la cepa 463Me. Ambas bacteriocinas pertenecen a la clase IIa, tipo pediocina, y exhiben actividad inhibitoria contra cepas del género *Listeria* como principal característica<sup>13</sup>.

En la tabla 2 se presenta el espectro de actividad de los sobrenadantes de ambas cepas. Como en otros casos de bacteriocinas de BAL tipo IIa, se observó actividad contra todas las cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* ensayadas. En este sentido, también los SLC exhibieron antagonismo contra *Lactobacillus plantarum* TwLb5 y todas las cepas de



**Figura 2** Curva de crecimiento (densidad óptica a 600 nm) y actividad inhibitoria (unidades arbitrarias) de las cepas *E. hirae* 463Me (a) y *E. hirae* 471Me (b).

*Enterococcus* utilizadas como blanco. Resulta un hecho especialmente llamativo la sensibilidad a estas bacteriocinas de las tres cepas resistentes a vancomicina (Van A, Van B y Van C). Sin embargo, los principios activos no resultaron efectivos contra *Lactococcus garvieae* 03/8460, *L. garvieae* 03/8702, *Lactococcus piscium* 23.3.92 y *Streptococcus iniae* MT 2376, cocos gram positivos y patógenos habituales en acuicultura. Además, los SLC no inhibieron a la cepa productora de nisina *Lactococcus lactis* ATCC 11454.

Dentro del espectro de bacilos gram negativos ensayados, solo *Vibrio anguillarum* V10, un patógeno de peces de mar, resultó sensible a la actividad de ambos sobrenadantes. En todos estos casos, exceptuando el de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212, *E. hirae* 471Me desarrolló una actividad más intensa que *E. hirae* 463Me.

En la [figura 2a](#) se puede observar la curva de crecimiento y la actividad inhibitoria de la cepa *E. hirae* 463Me en condiciones óptimas de crecimiento (35°C en caldo MRS). Se determinó una fase lag de aproximadamente 4 h y la máxima densidad poblacional se alcanzó a las 12 h de incubación, sin que se registraran variaciones hasta las 24 h. La producción de metabolitos antagónicos se detectó a las 2 h y alcanzó el máximo a las 8 h de incubación; dicho valor se mantuvo estable hasta las 24 h de ensayo.

La cepa 471Me ([fig. 2b](#)), bajo las mismas condiciones de cultivo, exhibió una fase lag más breve y alcanzó el máximo de población a las 10 h de comenzado el ensayo; asimismo, se mantuvo estable hasta las 24 h. Como en el caso anterior, la actividad inhibitoria se detectó a las 2 h de incubación y el máximo a las 6 h, sin registros de variación hasta las 24 h.

Utilizando *L. innocua* ATCC 33090 como bacteria blanco, en ambos casos se determinó una actividad máxima de 163.840 UA/ml, un valor nunca antes logrado en nuestra experiencia con cepas de *Enterococcus* aisladas del medio ambiente. Resulta difícil comparar la actividad antagonista con otras cepas de *E. hirae* bacteriocinogénicas reportadas en la literatura científica debido a diferencias en la metodología empleada y el espectro de cepas indicadoras.

## Conclusiones

La búsqueda bibliográfica efectuada permite afirmar que son escasas las cepas de *E. hirae* productoras de bacteriocinas aisladas hasta este momento. En consecuencia, creemos que son importantes los hallazgos aquí documentados, ya que sería este el primer reporte en el que se informa el aislamiento de estos microorganismos del medio marino y, concretamente, del contenido intestinal de mejillón patagónico.

El gen de la enterocina P se detectó en ambas cepas y el de la hiraecina JM79 solo en la cepa 471Me, pero dado lo particular del nicho ecológico del que provienen estos microorganismos, sería conveniente realizar estudios genéticos complementarios que pudieran dar información sobre la potencial presencia de una nueva bacteriocina.

Ambas cepas exhibieron una marcada actividad antagonista y con las pruebas fenotípicas y genotípicas efectuadas no revelaron la presencia de factores de virulencia; estas propiedades las convierten en potencialmente útiles para su uso en la conservación de alimentos o como probióticos para acuicultura.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Financiación

Este trabajo se financió con fondos otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2014-0575) y UNPSJB (SCT PI N.º 1341).

## Bibliografía

- Adnan M, Patel M, Hadi S. Functional and health promoting inherent attributes of *Enterococcus hirae* F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the freshwater fish *Catla catla*. PeerJ. 2017;5, <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.3085>, e3085e30925.
- Almeida T, Brandao A, Muñoz-Atienza E, Gonçalves A, Torres C, Igrejas G, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM, Poeta P. Identification of bacteriocin genes in enterococci isolated from game animals and saltwater fish. J Food Protec. 2011;74:1252–60.
- Arokiyaraj S, Islam V, Bharanidharan R, Raveendar S, Lee J, Kim D, Oh Y, Kim E, Kim K. Antibacterial, anti-inflammatory and probiotic potential of *Enterococcus hirae* isolated from the rumen of *Bos primigenius*. World J Microbiol Biotechnol. 2014;30:2111–8.
- Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45:493–6.
- Belgacem ZB, Abriouel H, Omar NB, Lucas R, Martínez-Canamero M, Gálvez A, Manai M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. Food Control. 2010;21:462–70.
- Bourafa N, Loucif L, Boutefnouchet N, Rolain J. *Enterococcus hirae*, an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient with benign prostatic hyperplasia: first case report in Algeria. New Microbe New Infect. 2015;8:7–9.
- Chang-Ho K, Yu-Jin S, Yong Gyeong K, Jae Seong S. Isolation of *Lactobacillus* strains from shellfish for their potential use as probiotics. Biotechnol Bioprocess Eng. 2016;21:46–52.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th Informational Supplement. Wayne, PA: EE.UU.; 2015. M100-S25.
- Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Chevalier P, Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. Mar Drugs. 2010;8:1153–77.
- De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J Mol Microbiol Biotechnol. 2007;13:194–9.
- De Vuyst L, Foulquié Moreno MR, Revets H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. Int J Food Microbiol. 2003;84:299–318.
- Eaton T, Gasson M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol. 2001;67:1628–35.
- Franz C, van Belkum M, Holzapfel W, Abriouel H, Galvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol Rev. 2007;31:293–310.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Microbiol. 1989;66:365–78.
- Gilad J, Borer A, Riesenberk K, Peled N, Shnaider A, Schlaeffer F. *Enterococcus hirae* septicemia in a patient with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998;17:576–7.
- Gómez Sala B, Herranz C, Freitas B, Hernández P, Cintas L. Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. Int J Food Microbiol. 2016;223:41–9.
- Gómez Sala B, Muñoz Atienza E, Sánchez J, Basanta A, Herranz C, Hernández P, Cintas L. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. Eur Food Res Technol. 2015;241:341–56.
- Grande Burgos MJ, Pulido RP, López Aguayo M, Gálvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. Int J Mol Sci. 2014;15:22706–27.
- Gupta A, Tiwari S, Natrebov V, Chikindas M. Biochemical properties and mechanism of action of Enterocin LD3 purified from *Enterococcus hirae* LD3. Antimicrobial. 2016;8:161–9.
- Hassan M, Brede D, Diep D, Nes I, Lotfipour F, Hojabri Z. Efficient inactivation of multi-antibiotics resistant nosocomial enterococci by purified hiraicin bacteriocin. Adv Pharm Bull. 2015;5:393–401.
- Henning C, Vijayakumar P, Adhikari R, Jagannathan B, Gautam D, Peter M, Muriana P. Isolation and taxonomic identity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail foods and animal sources. Microorganisms. 2015;3:80–93.
- Itoi S, Abe T, Washio S, Ikuno E, Kanomata Y, Sugita H. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. Int J Food Microbiol. 2008;121:116–21.



23. Jackson C, Fedorka Cray P, Barret J. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3558–65.
24. Juneja V, Dwivedi H, Yan X. Novel natural food antimicrobials. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3:381–3.
25. Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, Kaku M. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Methods.* 2001;47:11–6.
26. Kariyama R, Mitsuhata R, Chow J, Clewell D, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3092–5.
27. Manero A, Blanch A. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:4425–30.
28. Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. Genes 355 encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci 356 isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J Food Prot.* 2006;69:520–31.
29. Mills S, Stanton C, Hill C, Ross R. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011;2:299–329.
30. Özdemir GB, Oryaşın E, Bıyık HH, Özteber M, Bozdoğan B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian J Microbiol.* 2011;51:182–7.
31. Parada R, Beraud L, Andoro D, Sosa F, Marguet E, Vallejo M. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia – Argentina). *Bionatura.* 2017;2:456–9.
32. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact.* 2014;13 Suppl. 1:S3.
33. Pérez Sánchez T, Balcázar JL, García Y, Halaihel N, Vendrell D, de Blas I, Merrifield DL, Ruiz Zarzuela I. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis.* 2011;34:499–507.
34. Pinto A, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P, Gibbs P. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int J Food Microbiol.* 2009;129:50–8.
35. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, Klare I, Nallapareddy SR, Huang W, Murray BE. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis.* 2003;187:508–12.
36. Sánchez J, Dzung B, Diep DB, Herranz C, Nes IF, Cintas LM, Hernández P. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiraicin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol Lett.* 2007;270:227–36.
37. Schelegueda L, Vallejo M, Gliemmo MF, Marguet ER, Campos C. Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. *LTW Food Sci Technol.* 2015;64:794–801.
38. Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes M, Figueiredo Marques J, Tenreiro R, Barreto Crespo M. Comparative study using type strains and clinical and food isolated to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2569–76.
39. Sequeiros C, Vallejo M, Marguet E, Olivera N. Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. *Arch Microbiol.* 2010;192:237–45.
40. Sim J, Kim H, Oh K, Park M, Jung E, Jung Y. Spontaneous bacterial peritonitis with sepsis caused by *Enterococcus hirae*. *J Korean Med Sci.* 2012;27:1598–600.
41. Siragusa G. Production of bacteriocin inhibitory to listeria species by *Enterococcus hirae*. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:3508–13.
42. Talarmin J, Pineau S, Guillouzoic A, Boutoille D, Giraudeau C, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S. Relapse of *Enterococcus hirae* prosthetic valve endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1182–4.
43. Todorov S, Rachman C, Fourrier A, Dicks L, van Reenen C, Prévost H, Dousset X. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe.* 2011;17:23–31.
44. Vallejo M, Olivera NL, Sequeiros C, Marguet E. Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. *Analecta Vet.* 2009;29:5–9.
45. Werner G, Fleige C, Geringer U, van Schaik W, Klare I, Witte W. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect Dis.* 2011;11:80.
46. Zendo T, Eungruttanagorn N, Fujioka S, Tashiro Y, Nomura K, Sera Y, Kobayashi G, Nakayama J, Ishizaki A, Sonomoto K. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J Appl Microbiol.* 2005;99:1181–90.