

## Aislamiento de una cepa de *Enterococcus mundtii* bacteriocinogénico proveniente de *Hemiodema spectabilis* (pepino de mar)

Isolation of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* strain from *Hemiodema spectabilis* (sea cucumber)

Marisol Vallejo<sup>1,2</sup>, Franco M. Sosa<sup>1</sup>, Romina B. Parada<sup>1</sup>, Luis F. Aguirre<sup>1</sup>, Emilio R. Marguet<sup>1</sup>

### RESUMEN

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de una cepa de *Enterococcus mundtii* tw278 productora de bacteriocina aislada del contenido intestinal de *Hemiodema spectabilis* (pepino de mar), recolectado en la costa patagónica de la Argentina. La cepa se identificó mediante pruebas bioquímicas y análisis filogenético del gen ARNr 16S. Además, se detectó el gen estructural que codifica para la mundticina KS mediante técnicas de PCR. La investigación de los factores de virulencia reveló que la cepa de *E. mundtii* tw278 no presentó actividad gelatinasa ni hemolítica y fue susceptible a todos los antibióticos analizados, excepto la cefalotina. La máxima actividad inhibitoria se logró al final de la fase logarítmica cuando se utilizó el caldo MRS como medio de cultivo a 35 °C. Luego de 12 h de incubación, el sobrenadante libre de células (SLC) alcanzó un título de 163 840 unidades arbitrarias por mililitro contra la cepa indicadora de *Listeria innocua* ATCC 33090. El SLC exhibió actividad contra todas las cepas de *Listeria* ensayadas, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, enterococos resistentes a vancomicina (Van A, Van B y Van C), *Lactobacillus plantarum* TwLb 5 y *Vibrio anguillarum* V10. Este sería el primer estudio que informa el aislamiento de una cepa bacteriocinogénica de *E. mundtii* aislada del contenido intestinal de *Hemiodema spectabilis*.

**Palabras clave:** *Enterococcus*; mundticina; medio marino; Patagonia

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Argentina

<sup>2</sup> E-mail: soltrelew@gmail.com

Trabajo financiado con fondos otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología (PICT-2014-0575) y la UNPSJB - Proyecto «Potencial biotecnológico de enterococos aislados del medio marino patagónico»

Recibido: 4 de abril de 2018

Aceptado para publicación: 14 de septiembre de 2018

## ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the antibacterial activity of a bacteriocin-producing *Enterococcus mundtii* tw278 strain isolated from the intestinal content of *Hemiodema spectabilis* (sea cucumber) sampled in the Patagonian coast of Argentina. The strain was identified by biochemical tests and 16S rRNA gene phylogenetic analyses. The structural gene that codifies mundticin KS was detected by PCR. Investigation of virulence factors revealed that *E. mundtii* tw278 did not display gelatinase or hemolytic activity and was susceptible to all antibiotics assayed, except cefalotin. Maximum inhibitory activity was achieved at the end of logarithmic phase when MRS broth was used as culture media at 35 °C. After 12 h of incubation, cell-free supernatant (CFS) reached a titre of 163 840 arbitrary units per millilitre against the target bacteria *Listeria innocua* ATCC 33090. CFS showed activity against all the *Listeria* strains assayed, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, vancomycin-resistant enterococci (Van A, Van B and Van C), *Lactobacillus plantarum* TwLb 5 and *Vibrio anguillarum* V10. This would be the first study to report the isolation of a bacteriocinogenic *E. mundtii* strain from intestinal content of *Hemiodema spectabilis*.

**Key words:** *Enterococcus*; mundticin; marine environment; Patagonian

## INTRODUCCIÓN

Los enterococos pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL). Son microorganismos ubicuos, y constituyen una gran proporción de la microflora autóctona que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y de una variedad de animales de granja y silvestres, así como en alimentos como la carne, leche y quesos (Laukova y Czikková, 2001; Belgacem *et al.*, 2010). Pueden prolongar la vida útil de alimentos fermentados como resultado de la producción de agentes antimicrobianos, sintetizar compuestos que influyen en el sabor y contribuir a la promoción de la salud como cultivos probióticos (Gaggia *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas especies están asociadas e identificadas como agentes etiológicos de enfermedades intrahospitalarias, causando una alta incidencia de endocarditis, infecciones de las vías urinarias y en recién nacidos (Vu y Carvalho, 2011). A pesar de estos rasgos negativos, en los últimos años ha cobrado relevancia el género *Enterococcus*, debido a que se caracteriza por una alta producción de bacteriocinas, conocidas en forma general

como enterocinas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos catiónicos, de síntesis ribosomal, usualmente efectivos contra microorganismos filogenéticamente relacionados y, además, contra bacterias Gram positivas patógenas y/o que deterioran alimentos (Balciunas *et al.*, 2013).

La eficacia de las enterocinas contra cepas patógenas como *Listeria* sp, *Staphylococcus* sp y *Clostridium* sp, entre otras, está bien documentada en varios sistemas alimentarios (Lauková y Czikková, 2001; Vera Pingitore *et al.*, 2012); sin embargo, se dispone de poca información sobre el papel de las bacteriocinas en el tracto gastrointestinal. Se supone que la producción de bacteriocina es un mecanismo de defensa bacteriano, que proporciona a la cepa productora una ventaja competitiva contra microorganismos no productores y sensibles a la bacteriocina en el mismo nicho (Chen y Hoover, 2003).

La mayor parte de los estudios sobre la producción, caracterización, purificación y aplicación de las enterocinas se han llevado

a cabo en cepas aisladas de humanos, animales de cría y alimentos (Zendo *et al.*, 2005; Belgacem *et al.*, 2010; Özdemir *et al.*, 2011). En los últimos años son numerosos los trabajos que reportan especies del género *Enterococcus* productores de enterocinas aislados de vísceras de peces, tanto de agua dulce como salada (Migaw *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2015; Ghomrassi *et al.*, 2016). En comparación con otras especies de enterococos, el papel de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus mundtii* apenas se ha estudiado en sistemas alimentarios, habiéndose determinado su eficacia en brotes de soja (Bennik *et al.*, 1999), queso fresco Minas (Vera Pingitore *et al.*, 2012) y salmón ahumado envasado al vacío (Bigwood *et al.*, 2012).

En este estudio se evalúa la presencia de genes estructurales de enterocinas, los factores de virulencia mediante pruebas fenotípicas y la influencia del medio de cultivo, la temperatura y la fase de crecimiento sobre la producción de bacteriocina de la cepa *E. mundtii* tw278. Esta BAL se aisló del contenido intestinal de pepino de mar (*Hemiodema spectabilis*) y se seleccionó sobre la base de su actividad anti-Listeria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

La cepa de *E. mundtii* tw278 fue originalmente aislada a partir del contenido intestinal de *Hemiodema spectabilis* (pepino de mar) proveniente de la costa noreste de la provincia del Chubut (Playa Unión - Argentina). Para este estudio se obtuvo de la colección perteneciente al Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina). Se reactivó con sucesivos cultivos en caldo y agar de Man, Rogosa y Sharp (MRS, Biokar, Francia) y se conservó en Tripticosa Soja (TS) (Britania, Argentina) suplementa-

da con glicerol al 10% a -30 °C. La identificación fenotípica se realizó en un trabajo previo (Parada *et al.*, 2017), utilizando pruebas bioquímicas y fermentación de azúcares.

### Determinación de Factores de Virulencia

#### *Actividad de la gelatinasa*

Se realizó en agar TS suplementado con 0.8% (m/v) de gelatina. La placa se incubó durante 48 h a 37 °C y se reveló con una solución de ácido tricloroacético al 20% (v/v). Las zonas claras alrededor de la cepa se consideraron como positivas.

#### *Actividad hemolítica*

La producción de hemolisinas se evaluó en agar cerebro-corazón (Biokar, Francia) suplementado con sangre desfibrinada de conejo al 5%, luego de una incubación a 37 °C durante 48 h. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completo alrededor de la colonia ( $\beta$ -hemólisis).

#### *Producción de exopolisacáridos*

La producción de exopolisacáridos (EPS) de la cepa se evaluó de manera cualitativa en agar cerebro-corazón adicionado con sacarosa 50 g/l y 0.8 g/l de rojo Congo. La placa se incubó a 37 °C durante 24 h y el resultado se interpretó como positivo cuando se observaron colonias de color negro.

#### *Sensibilidad a antibióticos*

Las susceptibilidades antibióticas se evaluaron mediante la prueba de difusión en disco en agar Mueller-Hinton (Britania, Argentina) por el método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Los discos de sensibilidad a los antibióticos (Laboratorios Britania, Argentina) fueron: ampicilina (10  $\mu$ g), amoxicilina/clavulánico (20/10  $\mu$ g), cefalotina (30  $\mu$ g), eritromicina (15  $\mu$ g), rifampicina (5  $\mu$ g), trimetoprima/sulfametoxazol (1.25/23.75  $\mu$ g) y

vancomicina (30 µg). Las placas se incubaron a 37 °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 antibiogramas se interpretaron como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R), de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (2011).

### Actividad Inhibitoria del Sobrenadante

La actividad antibacteriana se determinó luego de cultivar la cepa en caldo MRS a 30 °C durante 18-20 h. Luego del periodo de incubación, el cultivo se centrifugó a 8000 g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante libre de células (SLC) se ajustó a pH 6.5-7 con NaOH 0.5 M (Anedra, Argentina) y se sometió a un calentamiento de 100 °C durante 5 min. Posteriormente, el SLC se filtró utilizando membranas Sartorius de 0.22 µm de diámetro de poro (Sartorius, Alemania) y se almacenó a -30 °C hasta la realización de los ensayos. La determinación de la actividad del SLC contra *Listeria innocua* ATCC 33090 se realizó por el método de difusión en placa, según lo descrito por Vallejo *et al.* (2014). En la evaluación del espectro de inhibición de la cepa *E. mundtii* tw278, seleccionada sobre la base de su actividad anti-*Listeria*, se utilizaron los microorganismos indicadores en las condiciones de crecimiento mencionadas en el Cuadro 1.

### Identificación Molecular

La cepa de *E. mundtii* tw278 se incubó en caldo MRS a 35 °C durante 18 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 12 000 g a 4 °C durante 5 min y el ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante la reacción de PCR se amplificó el gen que codifica ARNr 16S utilizando un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., EEUU), usando los

cebadores universales para procariotas 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), según lo describe DeLong (1992). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990). La secuencia del gen ARNr 16S de la cepa seleccionada designada como *E. mundtii* tw278 (1271 pb) se depositó en la base de datos del GenBank bajo el número de acceso KY689401.

### Detección de Genes Estructurales de Enterocinas

Los cebadores y protocolos utilizados en la reacción de PCR para la amplificación de los genes estructurales de las enterocinas se presentan en el Cuadro 2. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1.5%) a 70 v durante 1 h en buffer TAE (tris-acetato-EDTA) y se revelaron en bromuro de etidio (1 µg/ml).

### Influencia del Medio de Cultivo y Temperatura en la Producción de Enterocinas

Con el propósito de evaluar la actividad inhibitoria en diferentes medios comerciales se utilizaron los caldos MRS, M17 (Biokar, Francia), cerebro-corazón (Biokar, Francia) y TS. Todos los caldos se incubaron a 10, 15, 25, 30, 35, 40 y 45 °C durante 24-48 h y la actividad antimicrobiana se evaluó según lo descrito anteriormente utilizando *L. innocua* ATCC 33090.

### Curva de Crecimiento vs Actividad Anti-*Listeria*

Se determinó la curva de crecimiento y la actividad de la bacteriocina producida en las condiciones óptimas determinadas en los ensayos anteriormente descritos, durante 24 h.

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de la cepa *E. mundtii* tw278

Cepas indicadoras	Medio de cultivo y temperatura	Actividad antimicrobiana <i>E. mundtii</i> tw278
<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, 37 °C	++
<i>Enterococcus</i> Van A	MRS, 37 °C	++
<i>Enterococcus</i> Van B	MRS, 37 °C	++
<i>Enterococcus</i> Van C	MRS, 37 °C	++
<i>E. casseliflavus</i>	MRS, 37 °C	+++
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	MRS, 30 °C	-
<i>Lc. garvieae</i> 03/8460 <sup>b</sup>	MRS, 30 °C	-
<i>Lc. garvieae</i> 03/8702 <sup>b</sup>	MRS, 30 °C	-
<i>Lc. piscium</i> 23.3.92 <sup>b</sup>	MRS, 30 °C	-
<i>Streptococcus iniae</i> MT 2376 <sup>b</sup>	MRS, 37 °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>Pseudomona 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

<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. Fernández-Garayzabal (Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid)

Se tomaron muestras en forma aséptica cada 2 h para determinar su actividad antimicrobiana y 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 contra *L. innocua* ATCC 33090 y se expresó en unidades arbitrarias (AU) por mililitro de SLC.

## RESULTADOS

Los factores de virulencia evaluados mediante pruebas bioquímicas demostraron que la cepa de *E. mundtii* tw278 no presenta actividad de gelatinasa ni hemolítica; sin embargo, se detectó de manera cualitativa la producción de exopolisacáridos (EPS). La cepa presentó resistencia a cefalotina (30 µg),

Cuadro 2. Cebadores específicos para la detección de los genes estructurales de enterocinas mediante PCR

Enterocinas	Secuencia (5' - 3')	Fragmento (pb)	Referencia
A	entA f: GGTACCACTCATAGTGGAAA entA r: CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	De Vuyst <i>et al.</i> , 2003
B	entB f: CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG entB r: AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	
P	entP f: GCTACGCGTTCATATGGTAAT entP r: TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87	
LB50A	entL50A f: ATGGGAGCAATCGCAAATTA entL50A r: TTTGTTAATTGCCATCCTTC	274	
LB50B	entL50B f: ATGGGAGCAATCGCAAATTA entL50B r: TAGCCATTTTTCAATTTGATC	274	
91	ent 96 f: GTGGAGAGGACGAAAGGAGA ent 96 r: TTGATTAGTGGAGAGGACGGATTA	291	Henning <i>et al.</i> , 2015
31	bact 31 f: CCTACGTATTACGGAAATGGT bact 31 r: GCCATGTTGTACCCAACCATT	130	Özdemir <i>et al.</i> , 2011
1071 A/B	Ent 1071 f: GGGGAGAGTCGGTTTTTAG Ent 1071 r: ATCATATGCGGGTTGTAGCC	273	Martín <i>et al.</i> , 2006
EntQ	entQ f: ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA ent Q r: TTAACAAGAAATTTTTTCCCATGGCAA	105	Belgacem <i>et al.</i> , 2010
KS	mun KS f: TGAGAGAAGGTTTAAGTTTTGAAGAA mun KS r: TCCACTGAAATCCATGAATGA	379	Zendo <i>et al.</i> , 2005

mientras que resultó sensible al resto de los antibióticos ensayados.

La identificación bioquímica se confirmó mediante el secuenciamiento del gen ARNr 16S y posterior comparación con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank. La cepa estudiada exhibió un 100% de homología con *E. mundtii* DSM 4838.

La actividad antimicrobiana se evaluó contra microorganismos Gram positivos y negativos, mediante el método de difusión en placa (Cuadro 1). Los resultados demuestran que la cepa presenta actividad contra el género *Listeria* y otras BAL, y dentro del grupo de bacterias Gram negativas ensayadas solo se detectó inhibición contra *Vibrio anguillarum*.

Mediante la técnica de PCR se evaluó la presencia de genes estructurales conocidos de enterocinas de la clase II: subclase II.1 «familia de las pediocinas» (enterocina A, P, bact 31, mun KS), subclase II.2 «sin péptido señal» (enterocina Q, L50A y L50B) y subclase II.3 «estructura lineal» (enterocina B, 96 y 1071 A/B) empleando cebadores específicos. Solo se obtuvo una amplificación con el cebador para la mundticina KS (de tamaño compatible con lo esperado). Este resultado indica que la cepa presenta el gen *mun KS* y expresa la mencionada enterocina (datos no mostrados).

El efecto de la temperatura sobre la producción de la enterocina se estudió en caldo MRS, M17, TS y BHI en un rango de 10 a 45 °C (datos no mostrados). La mayor acti-

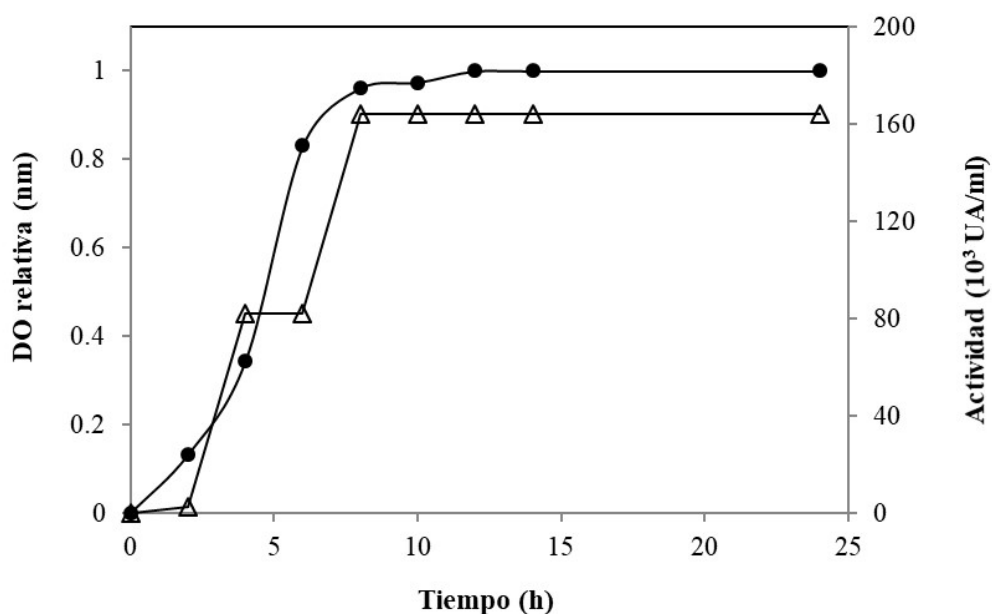


Figura 1. Curva de crecimiento (●) expresada en DO relativa y actividad antimicrobiana (Δ) de *E. mundtii* Tw278 en función de tiempo

vidad anti-*Listeria* se observó en los SLC provenientes de caldo MRS en el rango de temperatura 10-40 °C, obteniéndose un máximo a 35 °C; mientras que a 45 °C se produjo un descenso de la actividad inhibitoria. Resultados similares se obtuvieron con el caldo BHI, aunque siempre la actividad resultó inferior si se la compara con el medio MRS. Por otra parte, los medios M17 y TS resultaron poco adecuados para la producción de enterocina por parte de la cepa *E. mundtii* tw278.

La Figura 1 muestra la curva de crecimiento, expresada en DO relativa y el perfil de producción de enterocina en caldo MRS a 35 °C durante 24 h (condiciones óptimas). La producción comienza a partir de las 2 h de incubación, obteniéndose la máxima actividad (163 840 UA/ml) en el final de la fase exponencial y permaneciendo constante durante toda la fase estacionaria.

## DISCUSIÓN

Los enterococos constituyen una fracción importante de la microbiota intestinal autóctona de los mamíferos y otros animales. Una vez liberados al ambiente junto con las excretas, son capaces de colonizar diversos nichos ecológicos gracias a su capacidad para sobrevivir a las condiciones ambientales desfavorables y crecer en ambientes hostiles (Byappanahalli *et al.*, 2012). Estudios previos sugerían que este género microbiano no estaba usualmente asociado con ambientes acuáticos; sin embargo, su presencia es común en animales, tanto vertebrados como invertebrados marinos (Gómez-Sala *et al.*, 2015).

Las BAL se consideran microorganismos totalmente inoocuos para su incorporación en los alimentos. No obstante, el

estatus de GRAS (microorganismos reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés) no se extiende al género *Enterococcus*, debido a su carácter de patógeno oportunista ocasionando una cantidad considerable de infecciones nosocomiales adquiridas (Henning *et al.*, 2015). La expresión de la gelatinasa (enzima capaz de degradar a la gelatina, caseína y otros péptidos bioactivos) como la actividad hemolítica, constituyen algunos de los factores de virulencia importantes desde el punto de vista clínico a evaluar en el género *Enterococcus*. Se ha demostrado experimentalmente que la citolisina es una proteína que aumenta la patogenicidad en enfermedades enterocócicas en los modelos animales ensayados (Semedo *et al.*, 2003). La presencia y expresión de factores de virulencia parece estar íntimamente relacionada con el origen de las cepas (Eaton y Gasson, 2001). La cepa *E. mundtii* tw278 evaluada en este estudio no presentó actividad gelatinasa ni hemolítica en placa.

La producción de EPS desempeña un factor de interés industrial o un rasgo negativo a evaluar junto con otros factores de virulencia, según el origen y género de las BAL productoras. La producción de EPS juega un papel clave para la elaboración de quesos y yogures. Por otro lado, es importante determinar si la cepa productora exhibe rasgos de patogenicidad, ya que los EPS están relacionados con la capacidad de formar biofilm y la posibilidad de colonizar superficies inertes utilizadas habitualmente en clínica (Eaton y Gasson 2001). Según el resultado obtenido, sería prematuro clasificar a la cepa de *E. mundtii* tw278 como patógena por solo este rasgo. Se debe estudiar otros factores de patogenicidad relacionados con la producción de EPS, como la sustancia de agregación, cuya presencia incrementa considerablemente la adherencia a los túbulos renales, a células intestinales e internalización enterocócica en los macrófagos (Eaton y Gasson 2001).

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia intrínseca de grado variable a un gran número de antibióticos, pue-

den adquirir nuevas resistencias con una gran facilidad y contribuir a la diseminación fuera del ámbito hospitalario (Vu y Carvalho, 2011). En este estudio, la susceptibilidad de la cepa a los antibióticos evaluados, particularmente vancomicina y ampicilina, resultan de interés debido a que la resistencia a estos agentes determina la pérdida de sinergia entre aminoglucósidos y agentes activos sobre la pared celular, fundamental para el tratamiento de infecciones invasivas causadas por enterococos. La resistencia a cefalotina no presenta relevancia desde el punto de vista clínico, debido a que el género *Enterococcus* exhibe una resistencia natural a este antimicrobiano.

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas están clasificadas en cuatro clases dependiendo de su tamaño, estructura, propiedades químicas y físicas (Balciunas *et al.*, 2013). En este estudio, solo se detectó una amplificación de 380 pb cuando se utilizaron los cebadores específicos para la detección del gen estructural de la mundticina KS (Zendo *et al.*, 2005). La mencionada enterocina pertenece a la clase II (subclase II.1), familia de las pediocinas, con actividad anti-*Listeria*, alta estabilidad térmica y sensible a tripsina, según Parada *et al.* (2017). Si bien se dispone de estudios sobre enterococos bacteriocinogénicos provenientes de alimentos (Belgacem *et al.*, 2010), son escasos los estudios en cepas de origen marino (Migaw *et al.*, 2013; Gómez-Sala *et al.*, 2015; Ghomrassi *et al.*, 2016), y en el caso particular de *E. mundtii*, los reportes indican que las cepas provienen de nichos diferentes al marino (Zendo *et al.*, 2005; Bigwood *et al.*, 2012; Vera Pingitore *et al.*, 2012). Cabe destacar, que la enterocina producida por esta cepa no solo fue activa contra cepas de bacterias Gram positivas, sino también contra *V. anguilaum*, característica inusual para bacteriocinas de BAL. El medio marino, específicamente el patagónico, ha demostrado un gran potencial como fuente de BAL productoras de bacteriocinas (Sequeiros *et al.*, 2010; Schelegueda *et al.*, 2015), con potencial aplicación en acuicultura y preservación de alimentos provenientes de la pesca.



Los resultados obtenidos de producción de enterocina en diferentes medios y temperaturas de incubación son similares a trabajos previos en los que se utilizan medios comerciales y/o modificados (Settanni *et al.*, 2008; Todorov y Dicks, 2009). En el presente estudio, la máxima actividad anti-*Listeria* se obtuvo cuando se empleó el caldo MRS. El cultivo en caldo BHI exhibió resultados comparables con el caldo MRS, mientras que el M17 y TS resultaron poco eficientes para la producción de bacteriocina. Todos estos medios no selectivos son recomendados para el crecimiento de enterococos; sin embargo, la síntesis de la bacteriocina se vio marcadamente disminuida cuando se utilizaron el M17 y TS.

La síntesis de bacteriocinas depende principalmente de la fuente de nitrógeno utilizada y de carbono (carbohidratos). Este efecto se demostró modificando la composición del caldo MRS en el estudio de Vallejo *et al.* (2014) con la cepa de *E. mundtii* Tw56 aislado del contenido intestinal de pejerrey (*Odontesthes platensis*). Tanto el MRS como el BHI son medios que incluyen en sus formulaciones polipeptonas, hidrolizados y extractos de carne, fuentes de nitrógeno que estimulan la biosíntesis de péptidos antimicrobianos, mientras que el TS y M17 difieren de los anteriores en su cantidad y composición proteica. La selección de una adecuada fuente de carbono es importante para lograr una rápida duplicación celular y alcanzar una población suficiente que pueda sintetizar altos niveles de bacteriocinas (Settanni *et al.*, 2008; Todorov y Dicks, 2009; Vallejo *et al.* 2014). Trabajos previos sobre la optimización de los medios para la producción de bacteriocinas resultan contradictorios, toda vez que Aasen *et al.* (2000) y Todorov y Dicks (2004) demostraron que la producción de bacteriocinas puede lograrse en condiciones subóptimas, pero Settanni *et al.* (2008) determinaron que condiciones de estrés y deficientes concentraciones de factores nutricionales reducen drásticamente la producción de bacteriocinas en cepas de *E. mundtii*.

En general, la producción de bacteriocinas por BAL es un proceso sensible a la temperatura, por lo que no necesariamente su síntesis coincide con la temperatura óptima de crecimiento de la cepa (Leroy y De Vuyst, 1999). Delgado *et al.* (2005) sugirieron que la producción de bacteriocina se mejora cuando los microorganismos son cultivados en condiciones subóptimas de temperatura. No obstante, en el presente estudio la máxima producción se obtuvo a 35 °C, coincidiendo con Settanni *et al.* (2008) y Vallejo *et al.* (2014). A diferencia de otros enterococos proveniente de peces (Migaw *et al.*, 2013), la cepa *E. mundtii* tw278 no solo logró crecimiento poblacional cuando se la incubó a 10 °C durante 48 h, sino que además sintetizó bacteriocina. En consecuencia, la temperatura de incubación, la composición y modificación de los medios de cultivos podrían influenciar de manera positiva en la cantidad y actividad de la enterocina sintetizada. Estos parámetros, entre otros, deberían ser considerados a futuro con el propósito de optimizar la producción por parte de la cepa *E. mundtii* tw278.

La Figura 1 muestra una fase lag breve, seguida por una fase logarítmica que alcanzó el máximo poblacional a las 12 h de incubación. La actividad de la bacteriocina se detectó a partir de las 2 h de incubación (2560 UA/ml) y llegó a su máximo a las 12 h donde alcanzó las 163 840 UA/ml. A diferencia de otros trabajos (Todorov y Dicks, 2009; Vallejo *et al.*, 2014), la actividad permaneció constante durante toda la fase estacionaria. En este estudio, como en otros (Migaw *et al.*, 2014; Ghomrassi *et al.*, 2016), se demostró que la producción de la bacteriocina mantiene relación con el aumento de la biomasa; aunque este fenómeno no siempre está correlacionado con la concentración celular o la tasa de crecimiento (Delgado *et al.*, 2005). Los resultados de actividad anti-*Listeria*, expresados en UA/ml, y el espectro de inhibición resultan de gran interés y son comparables a los obtenidos por otros autores (Settanni *et al.*, 2008; Ghomrassi *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

La costa marina patagónica ofrece un hábitat con características fisicoquímicas y biológicas propias que permite el aislamiento de microorganismos con propiedades fisiológicas diferentes a las que se aíslan tradicionalmente de alimentos o de otros hábitats más explorados. Este sería el primer estudio que informa el aislamiento de una cepa bacteriocinogénica de *E. mundtii* aislada del contenido intestinal de *Hemiodema spectabilis*. Los altos valores de actividad anti-*Listeria* y la producción a bajas temperaturas hacen factible el potencial uso de la cepa como bio-preservante en alimentos.

## LITERATURA CITADA

1. **Aasen IM, Moretro T, Katla T, Axelsson L, Storro I. 2000.** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biot* 53: 159-166. doi: 10.1007/s002530050003
2. **Altschul SF, Gish W, Miller M, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** No basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
3. **Araújo C, Muñoz-Atienza E, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM, Igrejas G, Poeta P. 2015.** Evaluation of *Enterococcus* spp from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. *Foodborne Pathog Dis* 12: 311-322. doi: 10.1089/fpd.2014.1906.
4. **Balciunas EM, Castillo FA, Todorov SD, Gombossy BD, Converti A, Oliveira PR. 2013.** Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* 32: 134-142. doi: 10.1016/j.foodcont.-2012.11.025.
5. **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, TURKM. 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496. doi: 10.1093/ajcp/45.4\_ts.493
6. **Belgacem ZB, Abriouel H, Omar NB, Lucas R, Martínez-Canamero M, Gálvez A, Manai M. 2010.** Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control* 21: 462-470. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.007
7. **Bennik MH, van Overbeek W, Smid EJ, Gorris LG. 1999.** Biopreservation in modified atmosphere stored mung bean sprouts: the use of vegetable associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 28: 226-232. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00497.x
8. **Bigwood T, Hudson JA, Cooney J, McIntyre L, Billington C, Heinemann JA, Wall F. 2012.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus mundtii* isolated from soil. *Food Microbiol* 32: 354-360. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.015
9. **Byappanahalli MN, Nevers M, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. 2012.** Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol R* 76: 685-706. doi: 10.1128/MMBR.00023-12
10. **Chen H, Hoover DG. 2003.** Bacteriocins and their food applications. *Compr Rev Food Sci F* 2: 82-100. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x
11. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement M100-S21. Wayne, USA: CLSI. 168 p.

12. **de Vuyst L, Foulquié-Moreno M, Reverts H. 2003.** Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol* 84: 299-318. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00425-7
13. **Delgado A, Brito D, Peres C, Noé-Arroyo F, Garrido-Fernández A. 2005.** Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiol* 22: 521-552. doi: 10.1016/j.fm.2004.11.015
14. **DeLong EF. 1992.** Archaea in coastal marine environments. *P Natl Acad Sci USA* 89: 5685-5689.
15. **Eaton TJ, Gasson MJ. 2001.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microb* 67: 1628-1635. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001
16. **Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. 2010.** Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 141: 15-28. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031
17. **Ghomrassi H, ben Braiek O, Choiset Y, Haertlé T, Hani K, Chobert JM, Ghrairi T. 2016.** Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. *Dis Aquat Organ* 118: 31-43. doi: 10.3354/dao02953.
18. **Gómez-Sala B, Muñoz-Atienza E, Sánchez J, Basanta A, Herranz C, Hernández PE, Cintas LM. 2015.** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *Eur Food Res Technol* 241: 341-356. doi: 10.1007/s00217-015-2465-3.
19. **Henning C, Gautam D, Muriana P. 2015.** Identification of multiple bacteriocins in *Enterococcus* spp using an *Enterococcus*-specific bacteriocin PCR array. *Microorganisms* 3: 1-16. doi: 10.3390/microorganisms3010001
20. **Lauková A, Czikková S. 2001.** Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on “bryndza», a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiol Res* 156: 31-34. doi: 10.1078/0944-5013-00078
21. **Leroy F, de Vuyst L. 1999.** Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl Environ Microb* 65: 974-981.
22. **Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. 2006.** Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J Food Protect* 69: 520-531. doi: 10.4315/0362-028X-69.3.520
23. **Migaw S, Ghrairi T, Le Chevalier P2, Brillet B, Fleury Y, Hani K. 2013.** Isolation and characterization of enterococci bacteriocin strains from Tunisian fish viscera. *Food Nut Sci* 4:701-708. doi: 10.4236/fns.2013.46089
24. **Migaw S, Ghrairi T, Belguesmia Y, Choiset Y, Berjeaud JM, Chobert JM, Hani K, Haertlé T. 2014.** Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. *World J Microbiol Biotechnol* 30: 1207-1217. doi: 10.1007/s11274-013-1535-6
25. **Özdemir GB, Oryapın E, Býyyık HH, Özteber M, Bozdoğan B. 2011.** Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian J Microbiol* 51: 182-187.
26. **Parada R, Beraud L, Andoro D, Sosa F, Marguet ER, Vallejo M. 2017.** Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia, Argentina). *Bionatura* 2:456-459. doi: 10.21931/RB/2017.02.04.8
27. **Schelegueda LI, Vallejo M, Gliemmo MA, Marguet ER, Campos CA. 2015.** Synergistic antimicrobial action and

- potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. Food Sci Biotechnol 64: 794-801. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.017
28. **Semedo T, Almeida M, Martins P, Silva MF, Figueiredo JJ, Tenreiro R, Barreto MT. 2003.** 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 41: 2569-2576. doi: 10.1128/JCM.41.6.2569-2576.2003
  29. **Sequeiros C, Vallejo M, Marguet ER, Olivera NL. 2010.** 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 192: 237-245. doi: 10.1007/s00203-010-0552-1
  30. **Settanni L, Valmorri S, Suzzi G, Corsetti A. 2008.** The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. Food Microbiol 25: 722-728. doi: 10.1016/j.fm.2008.01.011
  31. **Todorov SD, Dicks LM. 2004.** Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. World J Microb Biot 20: 643-650.
  32. **Todorov SD, Dicks LM. 2009.** Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. Anaerobe 15: 65-73. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.11.002
  33. **Vallejo M, Ledesma P, Anselmino L, Marguet ER. 2014.** Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56. Rev Colomb Biotecnol 16: 174-179. doi: 10.15446/rev.colomb.-biote.v16n2.47238
  34. **Vera Pingitore E, Todorov SD, Sesma F, Franco BD. 2012.** Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. Food Microbiol 32: 38-47. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.005
  35. **Vu J, Carvalho J. 2011.** Enterococcus: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. Front Biol 65: 357-366. doi: 10.1007/s11515-011-1167-x
  36. **Zendo T, Eungruttanagorn N, Fujioka S, Tashiro Y, Nomura K, Sera Y, Kobayashi G, et al. 2005.** Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. J Appl Microbiol 99: 1181-1190. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.-02704.x