

Artículo original

Resistencia a metales pesados, antibióticos y factores de virulencia en cepas de *Enterococcus* aisladas en la provincia del Chubut, Argentina

Marisol Vallejo^{*a}, Pablo Ledesma^b, Cecilia Ibañez^a, Luis Fabián Aguirre^c, Romina Belén Parada^a, Bárbara Belén Vallejo^a, Emilio Rogelio Marguet^a

^aCátedra de Biología Celular y Molecular. ^bCátedra de Química Orgánica. ^cCátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Argentina.

Recibido 9 de marzo de 2016; aceptado 2 de agosto de 2016

Resumen: La contaminación por metales pesados (MP) constituye un problema creciente para la salud pública. La utilización de bioindicadores permite evaluar el impacto de la contaminación antrópica. En este estudio se evaluaron 730 cepas de *Enterococcus* provenientes de diferentes fuentes de la comarca VIRCh-Valdés (Provincia de Chubut), mediante la prueba de sensibilidad a Pb⁺⁺ por el método de dilución en placa, a concentraciones comprendidas entre 50 mg/L y 1.200 mg/L. De las cepas evaluadas, 223 exhibieron resistencia a plomo a concentraciones ≥ 50 mg/L. Dentro de este grupo se seleccionaron 22 aislados altamente resistentes a plomo (≥ 800 mg/L) con el objetivo de evaluar su resistencia a otros metales pesados, resistencia a antibióticos y determinar sus factores de virulencia. Todas las cepas seleccionadas mostraron alta sensibilidad a Hg⁺⁺, un patrón variable de resistencia frente a Cd⁺⁺ y Cr⁺⁶ y resistencia moderada a Ni⁺⁺. Las cepas resultaron susceptibles a ampicilina y penicilina, y presentaron un patrón variable de resistencia a los restantes antibióticos ensayados. Entre los factores de virulencia, se detectó actividad de gelatinasa en dos cepas y sólo una cepa exhibió actividad hemolítica. Estos resultados sugieren una relación entre la resistencia a metales pesados, resistencia a antibióticos y factores de virulencia en cepas de *Enterococcus* aisladas del medio ambiente.

Palabras clave: factores de virulencia, resistencia a antibióticos, metales pesados, *Enterococcus*.

Heavy metal resistance and virulence factors in *Enterococcus* strains isolated from the Chubut province, Argentina

Abstract: Contamination by heavy metals is a growing problem for public health and the use of bio-indicators are means for assessing anthropogenic pollution. In this study 730 *Enterococcus* strains were isolated from different sources of the region VIRCh - Valdés (Province of Chubut) were tested for sensibility to Pb⁺⁺ by the plate dilution method at concentrations ranging from 50 mg/L to 1200 mg/L. A total of 223 strains displayed resistance to lead at concentration ≥ 50 mg/L. Among this group, and on the basis of its high resistance to lead (≥ 800 mg/L), 22 strains were selected with the goal to determine antibiotic and heavy metal resistance pattern and also the presence of virulence traits. All isolates showed high sensibility to Hg⁺⁺, a variable pattern against Cd⁺⁺ and Cr⁺⁶, and moderate resistance to Ni⁺⁺. The strains were all susceptible to ampicillin and penicillin and displayed a variable pattern of resistance towards the remaining antibiotics assayed. Among the virulence traits determined, gelatinase production was detected in 2 strains and only one isolate showed hemolytic activity. The results obtained in this work suggest a relationship between heavy metal resistance, antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* strains isolated from the environment.

Keywords: virulence factors, resistance to antibiotics, heavy metals, *Enterococcus*.

* Correspondencia:

E-mail: soltrelew@yahoo.com.ar

Introducción

Como resultado de los procesos industriales y la producción de desechos, principalmente urbanos, el aumento del nivel de contaminación por metales pesados

(MP) se ha convertido en un problema creciente para la salud pública. Los MP se incorporan en el organismo a través de los alimentos, el agua, o como partículas en el aire que se respira, acumulándose hasta llegar a límites de toxicidad.

Entre todos los MP, el plomo, el cadmio, el mercurio, el níquel y el cromo son conocidos por su extrema toxicidad, incluso a bajas concentraciones [1]. Un alto nivel de exposición al plomo puede causar problemas en la síntesis de hemoglobina, efectos sobre los riñones, el tracto gastrointestinal, las articulaciones y daño crónico al sistema nervioso [2]. La mayor fuente de contaminación es la antropogénica, proveniente de la manufactura de pigmentos, pinturas, químicos, pesticidas, emisiones de automóviles, la minería y la quema de basura y carbón.

La utilización de marcadores biológicos o bioindicadores, como sensores de disturbios ambientales, constituye una herramienta accesible para evaluar el impacto de la contaminación antrópica. Entre estos bioindicadores podemos mencionar a los virus, parásitos, cianobacterias, enterobacterias y bacterias grampositivas. Dentro de este último grupo, el género *Enterococcus* resulta de gran interés debido a su condición de microorganismo ubicuo, altamente distribuido, con alta tolerancia a condiciones extremas (salinidad, pH, altas o bajas temperaturas, luz solar, deshidratación, etc.) y persistente en ambiente extraintestinal [3].

El género *Enterococcus* comprende 54 especies: *E. faecium* y *E. faecalis* son reconocidas como patógenos nosocomiales oportunistas; *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* se han identificado también como patógenos humanos [4].

En recientes trabajos se ha demostrado que los enterococos ambientales muestran características bioquímicas y genéticas que vinculan la resistencia a MP con la resistencia a antibióticos y factores de virulencia [5,6]. Dentro de los factores de virulencia, podemos mencionar la capacidad de formar biopelículas, la adherencia a tejidos del huésped, la secreción de productos tóxicos y la síntesis de enzimas hidrolíticas [6,7].

En la región patagónica son escasos los estudios sobre la presencia e impacto de MP en el ambiente. La mayor parte de la literatura está relacionada con los niveles de metales en zonas costeras, especialmente sedimento, material particulado y en organismos marinos [8], pero son nulos los estudios llevados a cabo en microorganismos y en hábitats diferentes al medio marino.

En otras regiones del mundo existe una preocupación creciente sobre el rol de los enterococos en ambientes disturbados, como potenciales reservorios de factores de virulencia debido al fenómeno de co-resistencia [7]. La resistencia a MP y factores de virulencia comparten elementos genéticos móviles que permitirían su proliferación y persistencia en el medio ambiente.

En este trabajo se aislaron cepas del género *Enterococcus* de diversas fuentes de la comarca denominada Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) – Península Valdés de la provincia del Chubut, Argentina, con el objetivo de determinar la presencia de cepas resistentes a MP y su potencial vinculación con factores de virulencia y resistencia a antibióticos.

Materiales y métodos

Área geográfica de la toma de muestras: La toma de muestras del estudio se llevó a cabo en el VIRCh y Península Valdés de la provincia del Chubut, Argentina. Estas zonas geográficas comprenden las localidades de Dolavon, Gaiman, Puerto Madryn, Puerto Pirámides, Rawson y Trelew. Las muestras se recolectaron desde marzo de 2012 hasta noviembre de 2013.

Toma de muestras, aislamiento y selección de cepas de enterococos: Las muestras provenientes de hisopados fecales de animales terrestres salvajes y de cría, sedimento y de agua se trasladaron en recipientes estériles, conservándose a 4 °C hasta el momento de su procesamiento. El tiempo transcurrido entre la colecta y su procesamiento no fue mayor de 12 h. Las muestras provenientes del tracto gastrointestinal de peces de agua dulce y de ambientes marinos se tomaron según las recomendaciones de Hagi *et al.* [9], mientras que para los invertebrados marinos y terrestres se llevaron a cabo según Rahimi *et al.* [10]. Las muestras de alimentos se obtuvieron con sacabocados estériles y se procesaron dentro de las 4 h.

Las muestras de animales y alimentos se sembraron en caldo púrpura de bromocresol-azida (Merck, Alemania) y las de medio marino o dulceacuícola en caldo etil violeta azida (EVA Difco, USA). Luego de 24 h de incubación a 37 °C los cultivos se repicaron a agar bilis esculina (Merck, Alemania), suplementado con ácido nalidixico (40 µg/mL) y nistatina (20 µg/mL). Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 24-48 h.

Las colonias se seleccionaron en función de la coloración de Gram, la morfología celular, las pruebas de catalasa y oxidasa, crecimiento a 45 °C a pH 9,6, hidrólisis de la esculina en presencia de sales biliares (40%), actividad de pirrolidoniol aminopeptidasa (PYR) y leucina-aminopeptidasa (LAP). Las cepas se conservaron a -30 °C en leche descremada al 10% (m/v) y glicerol al 10% (v/v).

Selección de cepas de enterococos resistentes a plomo: Las cepas aisladas se sometieron a la evaluación de resistencia a plomo. Se sembraron 5 µL de suspensiones bacterianas de 1×10^6 células/mL en placas de bilis esculina suplementadas con concentraciones de 50, 100, 200, 400, 800 y 1.200 mg/L de $Pb(NO_3)_2$. Las soluciones de plomo se prepararon en agua destilada, se esterilizaron mediante filtración por membrana (0,22 µm) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las placas se incubaron durante 5 días a 37 °C y se consideró crecimiento cuando se observó desarrollo de color negro en el medio citado.

Determinación de resistencia a cadmio, cromo, mercurio y níquel: Utilizando la técnica descrita anteriormente, las cepas seleccionadas por su alta resistencia al plomo (800-1.200 mg/L) se sometieron a concentraciones crecientes de las siguientes especies químicas de cationes: $CdCl_2$ (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L), CrO_3 (50, 100, 200 y 400 mg/L), $HgCl_2$

(10, 20 y 40 mg/L) y NiSO₄ (50, 100, 200, 400, 800 y 1.200 mg/L).

Identificación fenotípica y genotípica de los aislamientos: Las colonias seleccionadas pertenecientes al género *Enterococcus* se identificaron a nivel de especie, mediante fermentación de azúcares según el esquema propuesto por Manero & Blanch [11]. Luego de la identificación fenotípica preliminar, las cepas seleccionadas se confirmaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para tal fin, las cepas se incubaron a 37 °C durante 12 h en caldo Man, Rogosa y Sharpe (Biokar, Francia), se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics (Promega Madison, Wisconsin, EE.UU.). Los cebadores y protocolos utilizados para la amplificación de los genes específicos de especies fueron los descritos por Jackson *et al.* [12], mientras que para la identificación de género se utilizó el cebador *rrs* (16S ARNr) descrito por Kariyama *et al.* [13] como un control interno de PCR.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La electroforesis de los productos de la amplificación genética se realizó en gel de agarosa al 1,2%, a 70 V durante 1 h en buffer TAE (tris, ácido acético, EDTA, pH 8). Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio de 0,5 µg/mL; posteriormente se visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó.

Determinación de factores de virulencia:

Actividad de la gelatinasa: Se realizó en agar tripticosa soja (Britania, Argentina) suplementado con 0,8% (m/v) de gelatina. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y se revelaron con una solución de ácido tricloroacético al 20% (v/v). Las zonas claras alrededor de las cepas se consideraron como positivas [14].

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 completa alrededor de las colonias (β-hemólisis) [15].

Sensibilidad a antibióticos: La susceptibilidad a antibióticos se evaluó mediante la prueba de difusión en disco, en agar Müller-Hinton (Britania, Argentina), por el método de Kirby-Bauer [16]. Los discos empleados (Britania, Argentina) fueron: ampicilina (10 µg), ampicilina/sulbactama (10/10 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 UI), rifampicina (5 µg), trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) y vancomicina (30 µg). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las cepas *E. 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 Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute) [17].

Resultados

Se aislaron un total de 730 cepas pertenecientes al género *Enterococcus*, las que presentaron los rasgos fenotípicos que lo distinguen de otros cocos gram positivos (catalasa negativo y anaerobios facultativos). Del total de cepas aisladas, 223 (30,5%) resultaron resistentes al plomo. Para la selección de cepas resistentes y/o tolerantes al plomo, se ha recomendado como referencia una concentración \geq a 50 mg/L de plomo [5].

De estas cepas, se seleccionaron 22 que exhibieron las mayores resistencias a plomo (\geq 800 mg/L) con el propósito de evaluar la resistencia al resto de MP utilizados (Tabla 1). Estas cepas exhibieron una resistencia a mercurio (HgCl₂) =20 mg/L, a níquel (NiSO₄) entre 400 y 800 mg/L y a cromo (CrO₃) entre 100 y 200 mg/L. La resistencia a cadmio (CdCl₂) mostró valores de resistencia entre 20 y 100 mg/L, resultados más dispersos con respecto a los otros cationes ensayados.

Posteriormente, mediante las claves dicotómicas desarrolladas por Manero & Blanch [11] se clasificaron 17 cepas como *E. faecium*, una como *E. faecalis*, una como *E. avium*, una como *E. columbae*, mientras que las cepas E644 y E661 pudieron ser clasificadas en forma genotípica, utilizando cebadores específicos, como *Enterococcus durans* y *Enterococcus hirae*, respectivamente.

Sólo tres aislamientos exhibieron actividad de gelatinasa (E306, E618 y E664) y una cepa (E19) resultó β-hemolítica.

Todas las cepas seleccionadas exhibieron sensibilidad a ampicilina, ampicilina/sulbactama y penicilina, mientras que sólo cuatro resultaron sensibles a rifampicina (E272, E274, E478 y E539). Con respecto al resto de los antibióticos estudiados, tres cepas (E512, E539 y E618) resultaron resistentes a eritromicina, tres (E19, E618 y E684) a gentamicina, dos a la combinación trimetoprima/sulfametoxazol (E539 y E661) y cinco a vancomicina (E19, E618, E664, E670 y E684).

Discusión

Del total de cepas que presentaron resistencia al plomo, se seleccionaron las que exhibieron tolerancia de 800-1.200 mg/L de PbNO₃ (Tabla 1), concentraciones elevadas y comparables con trabajos previos realizados por Aktan *et al.* y Bhakta *et al.* para cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* respectivamente en ambientes altamente contaminados [5, 18].

El comportamiento de las cepas frente al Cd²⁺ (CdCl₂) presentó variación de resistencia en el rango de 20 a 100 mg/L, mientras que el Cr⁶⁺ (CrO₃) produjo inhibición de crecimiento entre 100 y 200 mg/L; en ambos casos, los

Tabla 1. Origen, ubicación geográfica y resistencia a metales pesados de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas.

Cepas	Identificación fenotípica	Origen	Ubicación geográfica	Resistencia a metales pesados (mg/L)				
				Pb ⁺²	Hg ⁺²	Cd ⁺²	Ni ⁺²	Cr ⁺⁶
E 19	<i>E. faecium</i>	Alimento (queso)	Trelew, Chubut	800	20	40	800	100
E 70	<i>E. faecium</i>	Alimento (embutido)	Trelew, Chubut	800	20	20	800	200
E 100	<i>E. faecium</i>	Agua dulce	Puerto Madryn, Chubut	800	20	20	400	200
E 272	<i>E. faecium</i>	Alimento (queso)	Trelew, Chubut	1.200	20	100	800	100
E 274	<i>E. faecium</i>	Alimento (queso)	Trelew, Chubut	800	20	50	800	200
E 306	<i>E. faecium</i>	Agua de tratamiento	Trelew, Chubut	800	20	80	800	200
E 315	<i>E. faecium</i>	<i>Paramolgula</i> sp. (papa de mar)	Playa Unión, Chubut	800	20	40	400	100
E 377	<i>E. faecium</i>	<i>Passer domesticus</i> (gorrión)	Playa Unión, Chubut	800	20	40	800	100
E 478	<i>E. faecium</i>	<i>Mytilusedulis platensis</i> (mejillón)	Puerto. Madryn, Chubut	1.200	20	20	800	200
E 512	<i>E. avium</i>	<i>Buccinanops globulosum</i> (caracol)	Puerto. Madryn, Chubut	800	20	20	400	200
E 515	<i>E. faecium</i>	<i>B. globulosum</i> (caracol)	Puerto. Madryn, Chubut	800	20	20	400	200
E 539	<i>E. faecium</i>	Alimento (queso)	Trelew, Chubut	800	20	20	800	100
E 559	<i>E. faecium</i>	<i>B. globulosum</i> (caracol)	Puerto. Madryn, Chubut	800	20	40	400	200
E 567	<i>E. faecium</i>	<i>B. globulosum</i> (caracol)	Puerto. Madryn, Chubut	1.200	20	40	400	200
E 618	<i>E. faecalis</i>	<i>Anas versicolor</i> (pato capuchino)	Trelew, Chubut	800	20	100	800	100
E 644	<i>E. durans/hirae</i>	<i>Ovis aries</i> (oveja)	Dolavon, Chubut	800	20	50	800	200
E 649	<i>E. columbae</i>	<i>O. aries</i> (oveja)	Dolavon, Chubut	800	20	100	800	200
E 661	<i>E. durans/hirae</i>	<i>O. aries</i> (oveja)	Trelew, Chubut	800	20	100	800	200
E 664	<i>E. faecium</i>	Agua dulce	Rawson, Chubut	800	20	100	800	100
E 665	<i>E. faecium</i>	Alimento para cerdos (maíz molido)	Dolavon, Chubut	800	20	20	800	200
E 670	<i>E. faecium</i>	Alimento para cerdos (soja)	Dolavon, Chubut	800	20	20	800	200
E 684	<i>E. faecium</i>	Alimento (embutido)	Trelew, Chubut	800	20	20	400	100

patrones de resistencia exhibidos resultaron inferiores a los descritos en trabajos previos realizados por Aktan *et al.*, Mondragón *et al.* y Kimiran-Erdem *et al.* [5,6,19].

En nuestro estudio, las cepas seleccionadas exhibieron una resistencia al Ni⁺² (NiSO₄) comprendida entre 400-800 mg/L, resultados comparables con los obtenidos por Niederhäusern *et al.* en cepas de *Enterococcus* aisladas en el lago Monte Cotugno, Italia [20]. No existen muchos trabajos con respecto al comportamiento de los enterococos frente a este catión, y a juzgar por las concentraciones determinadas en este trabajo y en el citado [20], pareciera que estos microorganismos presentan una alta tolerancia intrínseca.

Las 22 cepas seleccionadas exhibieron inhibición de crecimiento a concentraciones ≥ 20 mg/L de HgCl₂, niveles inferiores si se comparan con los descritos en el estudio de Mondragón *et al.* [6] realizado en cepas de *E. faecalis*. Los resultados indicarían que el mercurio no es un problema ambiental en la zona de estudio ya que no se advierte una presión selectiva sobre los aislamientos realizados.

La zona geográfica en estudio, el VIRCh y área de influencia, fue durante más de 2 décadas el asentamiento de numerosas fábricas textiles. Los metales cadmio, cromo, mercurio y plomo, son habitualmente hallados en las descargas de los efluentes de esta actividad industrial [21]. Sin embargo, los resultados hallados no muestran un ambiente disturbado con MP o con suficientes niveles como para lograr una selección de cepas de enterococos tolerantes o resistentes. A excepción del Pb, las concentraciones máximas determinadas para la resistencia a Hg, Cd, Ni y Cr indicarían valores iguales o más bajos que los encontrados en otros trabajos [5,6,19].

La distribución de especies encontrada en este estudio es comparable con los resultados expuestos en trabajos previos, en los cuales *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies predominantes en alimentos y animales [25], mientras que *E. hirae* y otras se han reportado en cuerpos de aguas residuales [22]. En nuestro caso particular, además de las especies antes mencionadas, se aislaron cepas de *E. avium* y *E. columbae* provenientes de caracol marino (*Buccinanops*

globulosum) y oveja (*Ovis aries*), respectivamente. Si bien se han aislado cepas de *E. columbae* de palomas [23] y *E. avium* en seres humanos, animales de cría y domésticos [24], las citadas especies son particularmente poco frecuentes en este tipo de nicho.

Se ha observado que las bacterias ácido lácticas (BAL) sufren la presión selectiva ejercida por los MP, que no sólo permiten el aislamiento de cepas con alta tolerancia [18] sino que se vislumbran como potenciales organismos utilizables en biorremediación.

A diferencia de otras BAL, el género *Enterococcus* no es considerado un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS, del inglés Generally Recognized As Safe), aunque algunas especies se utilizan como probióticos para humanos y animales [26]. En la actualidad los enterococos, específicamente *E. faecalis*, se encuentran dentro del grupo de microorganismos indicadores de contaminación fecal de las aguas y este último se considera como el indicador más eficiente para evaluar la calidad del agua de mar para uso recreativo [3].

En trabajos previos realizados por Eaton & Gasson [25] y Kanemitsu *et al.* [15], se detectó una alta frecuencia de aislamientos de enterococos provenientes de alimentos fermentados y aves que presentaban actividad gelatinasa, que parece estar ampliamente extendida en la naturaleza. Sin embargo, en este trabajo sólo se detectó actividad de esta enzima en las cepas E306 y E664 (*E. faecium*) y E618 (*E. faecalis*), provenientes de agua de tratamiento, agua dulce y pato, respectivamente. La frecuencia es baja comparada con los trabajos citados y esto puede deberse a la previa selección realizada sobre la resistencia a plomo; se podría inferir que ambos rasgos no están relacionados. Para afirmar esta posición podríamos citar un trabajo previo de Ledesma y col. [27], realizado en la misma área geográfica donde sí, se detectó una alta frecuencia de la expresión de gelatinasa en aves salvajes y de corral.

La citolisina es una proteína que tiene la capacidad de lisar eritrocitos humanos y además es activa contra otros cocos grampositivos, característica fisiológica que funciona como un mecanismo de defensa [25]. La actividad hemolítica, como los anteriores ensayos, se evaluó fenotípicamente en todas las cepas seleccionadas, detectándose sólo en una cepa de *E. faecium* (E19) proveniente de un alimento lácteo fermentado. Como se indicó posteriormente, la mencionada cepa exhibió además de actividad hemolítica resistencia a la vancomicina, características fisiológicas que la convierten en un microorganismo potencialmente peligroso, dada la posibilidad de diseminación y proliferación dentro de la población de consumidores.

En los últimos años, cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos han emergido como importantes patógenos nosocomiales, cuya evolución y diseminación de resistencia ha sido facilitada por el uso de antimicrobianos a nivel hospitalario y en la comunidad, así como también por su uso como promotores del crecimiento en la crianza de animales [7]. En Argentina, son escasos los estudios sobre reservorios y fuentes de enterococos

resistentes a antimicrobianos; la mayoría de los trabajos se han llevado a cabo en cepas provenientes de alimentos y de origen clínico [28,29].

Los enterococos exhiben resistencia intrínseca o resistencia relativa a diferentes clases de antibióticos, tales como β -lactámicos (penicilina y ampicilina), cefalosporinas, aminoglucósidos (gentamicina), lincosamidas, trimetoprima/sulfametoxazol, ácido nalidíxico y fluoroquinolonas [7]. En nuestro estudio, ninguna de las cepas seleccionadas presentó resistencia a ampicilina, penicilina y a ampicilina/sulbactama, mientras que sólo dos cepas (E539 y E661) resultaron resistentes a trimetoprima/sulfametoxazol y tres (E19, E618 y E684) presentaron resistencia a gentamicina. Estos resultados son comparables con los expuestos en trabajos previos para cepas de *E. faecalis* estudiadas en ambientes con alta contaminación antrópica [5,6,19].

Las pruebas realizadas permitieron detectar tres cepas resistentes a eritromicina y 16 a rifampicina; ambas resistencias son adquiridas mediante elementos genéticos móviles [7]. La resistencia a eritromicina es un rasgo ampliamente distribuido en este género [20] mientras que la resistencia a rifampicina es menos frecuente, pero vinculada directamente con resistencia a metales pesados por medio de mecanismos estructurales y funcionales comunes [30]. La alta frecuencia de cepas resistentes a la rifampicina dentro de la población seleccionada (16/22) permite afirmar este fenómeno.

Además de los resultados sobre resistencia a los antimicrobianos antes mencionados, la resistencia a vancomicina es la más preocupante, ya que este antibiótico es una de las últimas opciones terapéuticas en el tratamiento de algunas infecciones por bacterias grampositivas [7]. Los fenotipos VanA y VanB son, en el mundo, los de mayor distribución y se presentan especialmente en *E. faecalis* y *E. faecium*, aunque también han sido reconocidos en otras especies. Según nuestros resultados, se detectó resistencia a vancomicina en 4 cepas de *E. faecium* (E19, E664, E670 y E684) y una cepa de *E. faecalis* (E618). Esto difiere de lo hallado por Kimiran-Erdem *et al.* [19] y Aktan *et al.* [5], quienes no encontraron resistencia a vancomicina en las cepas de *E. faecalis* de origen acuático (Turquía), mientras que los estudios de Mondragón *et al.* [6], llevados a cabo en el Río Molola del estado de Nayarit (México), encontraron porcentajes de resistencia a vancomicina entre 11 y 27% en cepas *E. faecalis* según los sitios muestreados.

Los resultados obtenidos pueden relacionarse con una zona geográfica determinada, ya que coinciden en su frecuencia con los hallazgos de Ledesma y col. [27], realizados en cepas aisladas de aves. Se deberán realizar estudios posteriores que permitan revelar los genotipos responsables de tal resistencia, y determinar si se relacionan con elementos genéticos transmisibles o simplemente se trata de una característica intrínseca, como en el caso de algunas especies de enterococos [7].

Conclusiones

El alto número de aislamientos logrados en el trabajo confirma la naturaleza ubicua y alta resistencia a condiciones ambientales extremas del género *Enterococcus*. Su amplia distribución en la naturaleza y en ambientes asociados con la presencia humana, permite mediante la identificación y caracterización de cepas, determinar de forma indirecta el impacto sobre el ambiente y su potencial utilización como un bioindicador de disturbios antrópicos. En el caso particular de este estudio, la previa selección de cepas sobre la base de su tolerancia a plomo, permitió detectar en las mismas factores de virulencia y resistencia a antibióticos, aunque los resultados no fueron concluyentes. Estudios posteriores sobre la frecuencia de estos perfiles en la población total de enterococos ambientales permitirá establecer una relación entre los 2 grupos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, Comisión Nacional Salud Investiga “Beca Carrillo-Oñativia 2015” y la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco mediante el proyecto “Evaluación de la seguridad alimentaria y sanitaria de *Enterococcus* ambientales” PI R/7 222/2013.

Referencias

1. Coen N, Mothersill C, Kadhim M, Wright EG. Heavy metals of relevance to human health induce genomic instability. *J Pathol*. 2001; 195:293-9.
2. Barbosa F, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect*. 2005; 113:1669-74.
3. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012; 76:685-706.
4. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN). Genus *Enterococcus*. Disponible en: www.bacterio.net/enterococcus.html. Acceso: 20 de marzo de 2015.
5. Aktan Y, Tan S, Içgen B. Characterization of lead-resistant river isolated *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. *Environ Monit Assess*. 2012; 185:5285-93.
6. Mondragón VA, Llamas-Pérez DF, González-Guzmán GE, Márquez-González AR, Padilla-Noriega R, Durán-Avelar M de J, Franco B. Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environ Monit Assess*. 2011; 183:329-40.
7. Werner G, Coque TM, Franz CM, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, van Schaik W, Weaver K. Antibiotic resistant enterococci-ales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303:360-79.
8. Gil MN, Harvey M, Esteves JL. Metal content in bivalve molluscs from the San Jose and Nuevo Gulfs, Patagonia, Argentina. *Mar Poll Bull*. 1988; 19:181-2.
9. Hagi T, Tanaka D, Iwamura Y, Hoshino T. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*. 2004; 234:335-46.
10. Rahimi H, Gires U, Asmat A. Antimicrobial activity of bacteria associated with various marine sources. *Adv Environ Biol*. 2013; 7:356-65.
11. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65:4425-30.
12. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barret JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:3558-65.
13. Kariyama R, Mitsuhashi R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:3092-5.
14. 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; 47:11-16.
15. Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, et al. 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.
16. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45:493-6.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2-A7. 7th ed. Wayne PA, USA; 2007.
18. Bhakta JN, Munekage Y, Ohnishi K, Jana BB. Isolation and identification of cadmium- and lead-resistant lactic acid bacteria for application as metal removing probiotic. *Int J Environ Sci Technol*. 2012; 9:433-40.
19. Kimiran-Erdem A, Arslan EO, Sanli Yurudu NO, Zeybek Z, Dogruoz N, Cotuk A. Isolation and identification of enterococci from seawater samples: assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals. *Environ Monit Assess*. 2007; 125:219-28.
20. Niederhäusern S, Bondi M, Anacarso I, Iseppi R, Sabia C, Bitonte F, Messi P. Antibiotics and heavy metals resistance and other biological characters in enterococci isolated from surface water of Monte Cotugno Lake (Italy). *J Environ Sci Health, Part A*. 2013; 48:939-46.
21. Joshi V, Santani D. Physicochemical characterization and heavy metal concentration in effluent of textile industry. *Univ J Environ Res Techn (UJERT)*. 2012;

- 2:93-6.
22. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iran Biomed J.* 2007; 11:161-7.
 23. Devriese LA, Ceysens K, Rodrigues UM, Collins MD. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 71:247-51.
 24. Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J Appl Microbiol.* 2010; 109:539-47.
 25. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:1628-35.
 26. Ferreira Araujo T, de Luces Fortes Ferreira CL. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Braz Arch Biol Technol.* 2013; 56:457-66.
 27. Ledesma P, Parada RB., Vallejo M, Marguet ER. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia. *Analecta Vet.* 2015; 35: 6-12.
 28. Delpech G, Sparo M, Pourcel G, Schell C, De Luca MM, Basualdo JA. *Enterococcus* spp. aislados de queso de oveja: resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2013; 33:129-33.
 29. Corso AC, Galletti PS, Rodríguez MM, Melano RG, Ceriana PG, Faccone DF *et al.* Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int J Infect Dis.* 2007; 11:69-75.
 30. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 2006; 14(4):176-82.