

***Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de *Penaeus vannamei* propiedades de seguridad, tecnológicas y probióticas**

***Enterococcus faecium* isolated from the intestinal contents of *Penaeus vannamei*: safety, technological, and probiotic properties**

Castañeda-Ruelas, G.M.¹, Gámez-Bayardo, S.¹, Domínguez-Lagunes, S.¹, Fierros-Pérez, C.E.², Durán-Pérez, S.¹, Hernández-Díaz, L.J.¹, Jiménez-Edeza, M.^{1*}

¹Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico, CAEF Gestión de la Calidad e Inocuidad Alimentaria UAS-CA-323, Programa de Posgrado Integral en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México, CP. 80013. ²Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México, CP. 80013.

RESUMEN

La microbiota intestinal del camarón (*Penaeus vannamei*) ha sido reconocida como fuente de bacterias probióticas útiles para su aplicación biotecnológica. El objetivo de este estudio fue evaluar la sobrevivencia y actividad probiótica *in vitro* de cinco cepas ácido-lácticas aisladas de camarón. Las cepas fueron aisladas del intestino del camarón y analizadas mediante la secuenciación del gen ADN_r 16S. La sobrevivencia de las cepas se evaluó mediante retos de acidez (pH 3, 5, 6 y 7), temperatura (4, 15, 30, 37 y 45 °C) y salinidad (4%, 6% y 8% NaCl) durante 24 h. La capacidad tecnológica, probiótica y seguridad de las cepas fueron determinadas por diversas pruebas *in vitro*. Las cinco cepas nativas correspondieron a la orden *Lactobacillales*, y se relacionaron filogenéticamente (>99.9 %) con la cepa *Enterococcus faecium* (DSM_20477). El análisis multivariante indicó un carácter de sobrevivencia similar (≈ 94 %) entre las cepas de *E. faecium*, cuya proliferación ocurre a condiciones >15 °C, pH 5 - 7 y <6% NaCl. La capacidad probiótica varió entre las cepas de *E. faecium* (P < 0.05) según las propiedades de hidrofobicidad, autoagregación, coagregación y antagonista. El potencial tecnológico de las cepas fue similar según su poder acidificante, proteolítico y lipolítico (P > 0.05). La sensibilidad a siete antibióticos y ausencia de hemólisis fue también observada en todas las cepas. Las características fisiológicas de las cepas autóctonas del intestino del camarón permiten proponerlas como potenciales agentes probióticos para el desarrollo de productos biotecnológicos.

PALABRAS CLAVE: Camarón, *Enterococcus*, Microbiota, Probiótico.

ABSTRACT

The gut microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*) has been recognized as a source of probiotic bacteria and beneficial for biotechnological applications. The aim of this study was to evaluate the survival and probiotic activity *in vitro* of five lactic acid strains isolated from shrimp. The strains were isolated from the shrimp gut and analyzed by sequencing the 16S rDNA gene. The survival of the strains was evaluated by challenges of acidity (pH 3, 5, 6, and 7), temperature (4, 15, 30, 37, and 45 °C) and salinity (4%, 6% and 8% NaCl) for 24 h. The technological, probiotic and safety capacity of the strains were determined by various *in vitro* tests. The five native strains corresponded to the order *Lactobacillales* and were phylogenetically related (>99.9%) to the *E. faecium* strain (DSM_20477). Multivariate analysis indicated a similar survival rate (≈ 94%) among *E. faecium* strains, whose proliferation occurs at conditions >4 °C, pH 5 - 7, and <6% NaCl. Probiotic capacity varied among *E. faecium* strains (P < 0.05) according to hydrophobicity, self-aggregation, co-aggregation, and antagonistic properties. The technological potential of the strains was similar according to their acidifying, proteolytic, and lipolytic power (P > 0.05). Sensitivity to seven antibiotics and the absence of hemolysis were also observed in all strains. The physiological characteristics of autochthonous strains of shrimp gut allow them to be proposed as potential probiotic agents for developing of biotechnological products.

KEYWORDS: Shrimp, *Enterococcus*, Microbiota, Probiotic.

*Autor de correspondencia: Maribel Jiménez Edeza

E-mail: mjimenez@uas.edu.mx

ORCID ID: [0000-0002-9835-9665](https://orcid.org/0000-0002-9835-9665)

Registro ORCID Autores: CRGM. [0000-0001-8970-0035](https://orcid.org/0000-0001-8970-0035); GBS: [0000-0001-9592-6743](https://orcid.org/0000-0001-9592-6743); DLS: [0000-0002-8101-154](https://orcid.org/0000-0002-8101-154); FPCE: [0009-0001-9824-7989](https://orcid.org/0009-0001-9824-7989); DPSA [0000-0002-1009-2020](https://orcid.org/0000-0002-1009-2020); HDLJ [0000-0002-6962-1855](https://orcid.org/0000-0002-6962-1855)

FECHA DE ENVÍO: 10 DE SEPT 2024

FECHA DE PUBLICACIÓN: 30 DE OCT 2024

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la pesca y acuicultura constituyen uno de los sectores de producción de alimentos de origen animal de mayor crecimiento económico, debido al rendimiento de cosecha y valor monetario del producto. A nivel mundial, se estima que la actividad tiene una derrama económica de 4 600 millones de dólares anuales (FAO, 2022). La camaricultura es una de las técnicas más atractivas de la acuicultura, dado que el camarón figura como uno de los productos mayormente comercializados a nivel mundial, y producidos principalmente en Asia y América Latina (FAO, 2020). La especie más cultivada en estas áreas corresponde a *Penaeus vannamei* (camarón patiblanco) con 4 966 mil toneladas anuales (FAO, 2020).

Es reconocido que la camaricultura se encuentra constantemente amenazada por diversos agentes infecciosos virales (virus de la cabeza amarilla, virus del síndrome de la mancha blanca, síndrome de crecimiento lento) y bacterianos (vibriosis) causantes de enfermedades que afectan el crecimiento, desarrollo y producción del camarón, pudiendo llegar a causar la muerte de este y generando grandes pérdidas económicas (Wikumpriya *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2022). Para el control de las enfermedades infecciosas se recurre generalmente al uso de agentes antimicrobianos, cuyo espectro de acción puede ser limitado para la prevención y control de las enfermedades, y el uso desmedido de estos agentes favorecen la contaminación del medio ambiente, la emergencia de microorganismos multirresistentes, la pérdida de la sanidad del animal y el riesgo en la salud del consumidor (Wikumpriya *et al.*, 2023).

Actualmente, existe un interés creciente en la utilización de compuestos fitoquímicos (Gámez-Bayardo *et al.*, 2021), bacteriófagos (Ninawe *et al.*, 2020), vacunas (Amatul-Samahah *et al.*, 2020), agentes probióticos (Hai, 2015), productos simbióticos (Abdel-Latif *et al.*, 2022), inmunostimulantes (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2022) y métodos epigenéticos (Wikumpriya *et al.*, 2023) como métodos de vanguardia para mejorar la calidad y seguridad de la actividad acuícola. Los agentes probióticos son microorganismos con propiedades bioactivas que ofrecen promisoriamente mejorar la salud y nutrición de animales en gorda, incluyendo el camarón (Hai, 2015; Oussaief *et al.*, 2020; Abdel-Latif *et al.*, 2022). El aislamiento y la caracterización de los microorganismos probióticos nativos es un área de interés, dado que para su uso deben cumplir con requisitos de seguridad (patogenia y resistencia antimicrobiana), carácter funcional y potencial tecnológico mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos bioactivos benéficos (Oussaief *et al.*, 2020).

Particularmente, el género *Enterococcus* son un grupo de coccos Gram + que pertenecen a la familia de *Lactobacillus*, y han sido reconocidos como bacterias ácido-lácticas que pueden comportarse como patógenos, comensales o simbiotes intestinales del hospedero (Hanchi *et al.*, 2018). *Enterococcus faecium* se considera una de las especies más importantes de este género que es utilizada como agente de fermentación y probiótico sin reporte de efectos adversos (Zommiti *et al.*, 2022). Adicionalmente, el carácter versátil de *E. faecium* para resistir y sobrevivir en diversas condiciones ha sido descrito como características que favorecen su aprovechamiento industrial (Oussaief *et al.*, 2020). Actualmente, se han comercializado varias cepas de *E. faecium* para su uso como tratamiento preventivo de enfermedades infecciosas y suplemento alimenticio para el hombre y animales (Zommiti *et al.*, 2022).

La demanda mundial de soluciones libres de químicos y menos dañinas que soporten la sanidad y engorda de los productos pesqueros se han señalado necesarias para atender los objetivos de desarrollo sostenible vinculados a la práctica acuícola. Por ello, el objetivo del presente estudio fue obtener nuevas cepas probióticas adaptadas al camarón y hábitat marino. Posteriormente, se evaluó *in vitro* la sobrevivencia, el potencial probiótico y tecnológico para exponer su posible uso como agentes bioactivos para la industria acuícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Se recolectaron asepticamente muestras de heces y tripas de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* que se encontraban en estanques de cultivo experimental y alimentados con una formulación comercial a base de proteína de pescado (Camaronina Plus®). Las muestras recolectadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso. Brevemente, se homogeneizó 1 g del intestino o heces de camarón con 9 mL de solución salina (NaCl 0.9%, p/v) durante 2 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron (0.1 mL) en agar de Man Rogosa y Sharpe suplementado con L-Cisteína (0.5 g/L) (MRS-Cys). Los cultivos se incubaron a 37 °C por 72 h en condiciones anaeróbicas. Las colonias seleccionadas se purificaron en agar MRS-Cys y se preservaron en caldo MRS-Cys con glicerol (28%, v/v) a -20 °C hasta su uso.

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN bacteriano se extrajo a partir de cultivos puros en caldo MRS-cys. Brevemente, los cultivos se centrifugaron a 4 500 rpm durante 10 min, y

la pastilla se resuspendió con amortiguador de fosfatos. La suspensión se transfirió a un microtubo, se añadieron 450 μL de solución 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH) / 0.5%, v/v de docecilsulfato sódico (SDS) y 225 μL de solución 3 M de acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) / 1.8 M de ácido acético (CH_3COOH), y se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm por 5 min. Los sobrenadantes se recuperaron en microtubos (600 μL) que contenía isopropanol grado reactivo, y se almacenaron -20°C por 24 h. Posteriormente, se añadieron 500 μL de solución de etanol al 70%, y se centrifugaron a 15 000 rpm por 5 min. La pastilla se homogenizó con 200 μL de agua nanopura, el ADN extraído se almacenó a -80°C hasta su uso.

IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIA ADN 16S Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para la amplificación se utilizó la región del gen ADNr 16S utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μL , y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: paso inicial de desnaturalización de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación [94°C por 1 min (desnaturalización), 56°C por 1 min (alineamiento) y 72°C por 1 min (extensión)], y extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se purificaron, y posteriormente el gen ADNr 16S fue secuenciado por MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). La calidad de las secuencias del gen ADNr 16S se analizaron con el programa Geneious (v8.1.6). Para la comparación *in silico* de las secuencias se utilizó el programa 16S biodiversity tool y la base de datos del GenBank utilizando el MOLE-BLAST. El árbol filogenético se construyó utilizando el programa FastTree (v.2.1.11).

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Para la preparación de la suspensión bacteriana, se inoculó una colonia en 10 mL de MRS-cys, y se incubó a 37°C por 24 h en condiciones de anaerobiosis. El cultivo se centrifugó (5 000 rpm por 10 min a 4°C), y la pastilla se disolvió en amortiguador de fosfato (PBS) 1X para ajustar una concentración de 1.0×10^8 Unidades formadoras de colonia (UFC)/mL (OD = 0.1, $\lambda = 625 \text{ nm}$).

CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA

ACTIVIDAD ACIDIFICANTE

Las suspensiones bacterianas estandarizadas se inocularon en leche desnatada de vaca estéril al 1%, y los cultivos se incubaron a 37°C . El cambio de pH y la concentración bacteriana (UFC/mL) se determinaron

durante 48 h (0, 3, 6, 12 y 24 h) usando un medidor de pH y cuenta total en placa, respectivamente.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, pH Y NaCl

Para la evaluación del crecimiento microbiano frente a diferentes condiciones de temperatura (4, 15, 30, 37°C y 45°C), pH (3, 5, 6 y 7) y cloruro de sodio (NaCl) 4, 6 y 8% p/v, se inocularon las suspensiones bacterianas estandarizadas en caldo MRS-cys al 1% previamente ajustado con cada condición. Los ensayos de pH y NaCl se incubaron a 37°C . Mientras que, los ensayos de temperatura se incubaron según el tratamiento y se ajustaron a pH 7. El pH de los medios fue ajustado con soluciones de 0.1 M de NaOH y 0.1 M de ácido clorhídrico (HCl) antes de que los medios fueran esterilizados. La concentración bacteriana (UFC/mL) se cuantificó por diluciones seriadas y cuenta total en placa durante los tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 h.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA

La actividad proteolítica (AP) y lipolítica (AL) se evaluaron según el método descrito por Moslehishad *et al.* (2013) y Meng *et al.* (2018), respectivamente. Alícuotas de 50 μL de cada sobrenadante obtenidos tras la centrifugación ($5\,000 \times g$, 10 min, 4°C) de un cultivo bacteriano en caldo MRS-cys fueron depositados en pozos ($\varnothing = 6.5 \text{ mm}$) de placas agar de leche descremada al 1% para AP y agar tributirina al 1% para AL. La placa se incubó a 37°C por 24 h y 72 h para AP y AL, respectivamente. La AP y AL se determinaron midiendo el diámetro (mm) de las zonas claras alrededor de los pozos.

CARACTERIZACIÓN PROBIÓTICA

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

Para evaluar la actividad antagonista se utilizaron las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Se extendió 1 mL de la suspensión bacteriana ajustada (1.0×10^8 UFC/ml) de cada de cada cepa en cajas de agar Mueller-Hilton, y se colocaron 50 μL del cultivo de bacteria ácido lácticas (1.0×10^8 UFC/mL) en pozos ($\varnothing = 6.5 \text{ mm}$) previamente hechos en el medio de cultivo. Un sensidisco de sulfamethoxazole-trimethoprim 30 μg se incluyó como control de fenotipo de susceptibilidad. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando la Ecuación (1) descrita por Mohd *et al.* (2020):

$$\frac{\text{Zona de inhibición (ZOI)} = \text{ZOI (mm)} - \text{Diámetro del pozo (mm)}}{(1)}$$

AUTOAGREGACIÓN

La autoagregación se realizó siguiendo la metodología establecida por Angmon *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Alícuotas de 4 mL de una suspensión bacteriana estandarizada en PBS se agitaron por 10 s, y se incubaron a 37 °C por 4 h. La absorbancia de las muestras se midió a 600 nm. El porcentaje de la autoagregación fue expresado usando la Ecuación (2):

$$\% \text{ Autoagregación} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

Donde A_t y A_0 representan la absorbancia en el tiempo 4 h y tiempo 0 h, respectivamente.

COAGREGACIÓN

Para la coagregación se siguió la metodología descrita por Collado *et al.* (2008). Las cepas bacterianas patógenas utilizadas fueron: *S. aureus* (ATCC 29213), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. Typhimurium* (ATCC 14028) y *E. coli* (ATCC 25922). Brevemente, se prepararon suspensiones en PBS de las bacterias ácido-lácticas y de las cepas patógenas descritas previamente. Posteriormente, se mezclaron 2 mL de las suspensiones celulares de las cepas patógenas con 2 mL de las bacterias ácido-lácticas por 10 s, y se incubaron a 37 °C por 4 h. Alícuotas individuales de 4 mL de las bacterias ácido-lácticas y 4 mL de las cepas patógenas se incluyeron como controles. La absorbancia de las muestras se midió a 600 nm. El porcentaje de la coagregación fue determinado usando la Ecuación (3):

$$\% \text{ Coagregación} = \left(\frac{\frac{A_x + A_y}{2} - (A_{x+y})}{\frac{A_x + A_y}{2}}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

Donde A_x y A_y representan la absorbancia de la suspensión de las bacterias ácido-lácticas y bacterias patógenas, respectivamente. A_{x+y} representa la absorbancia de la mezcla de las bacterias ácido-lácticas y cepas patógenas.

HIDROFOBICIDAD

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana se calculó midiendo la adhesión microbiana a los hidrocarburos, de acuerdo con la metodología propuesta por Santos *et al.* (2016). Se añadieron 1 mL de hexano a cada una de las suspensiones de las bacterias ácido-lácticas ajustadas (OD = 1.0, $\lambda = 625$ nm) en PBS (A_0), y se dejaron reposar por 10 min a a 25 °C para crear una suspensión de dos fases. Posteriormente, se agitaron por

2 min y se dejaron reposar por 20 min a 25 °C. Finalmente, se removió la fase acuosa y se midió su absorbancia a 600 nm (A). La hidrofobicidad se calculó con la Ecuación (4):

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = \left(1 - \frac{A_0}{A}\right) \times 100 \quad (4)$$

Donde A_0 y A corresponden a los valores de absorbancia inicial y final, respectivamente.

CARACTERIZACIÓN DE LA SEGURIDAD

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Para la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana se siguió el método de difusión Kirby-Bauer y los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos (CLSI, 2016). Un panel de 13 antibióticos fue utilizado: cloranfenicol (C, 30 $\mu\text{g/mL}$), tetraciclina (Te, 30 $\mu\text{g/mL}$), amikacina (AK, 30 $\mu\text{g/mL}$), gentamicina (GN, 10 $\mu\text{g/mL}$), ácido nalidíxico (NA, 30 $\mu\text{g/mL}$), ceftazidima (CAZ, 30 $\mu\text{g/mL}$), ampicilina (AMP, 10 $\mu\text{g/mL}$), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 $\mu\text{g/mL}$), sulfisoxazol (G, 25 $\mu\text{g/mL}$), neomicina (N, 30 $\mu\text{g/mL}$), estreptomina (S, 10 $\mu\text{g/mL}$), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC, 30 $\mu\text{g/mL}$) y cefoperazona (CFP, 75 $\mu\text{g/mL}$). Brevemente, se extendió una alícuota de 1 mL de cada suspensión de las bacterias ácido-lácticas (1.0×10^8 UFC/mL) en placas de agar Müller Hinton y se colocaron los sensidiscos sobre la superficie de la placa inoculada. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Para medir el diámetro (mm) de los halos de inhibición de las bacterias ácido-lácticas sobre el agar se utilizó un Vernier. Basados en los halos de inhibición (mm), las bacterias se clasificaron como sensible, intermedio y resistente de acuerdo con los criterios de inhibición reportados por la CLSI (2016). Se calculó el índice de multiresistencia (IMR) a antibióticos como el cociente del número de antibióticos con fenotipo de resistencia entre el total de antibióticos evaluados (Krumperman *et al.*, 1983). Los ensayos se realizaron por duplicado.

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Se extendió una alícuota de 1 mL de cada suspensión bacteriana (1.0×10^8 UFC/mL) en placas de agar sangre de ternera al 5%. Posteriormente, las cajas de Petri fueron incubadas a 37 °C por 48 h. La hemólisis se revisó visualmente y se clasificó como α (halo verdoso), β (halo claro) o γ (sin halo). Los ensayos se realizaron por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el programa Minitab versión 17.0 y Excel versión 16.75.2. Brevemente, los

datos se expresaron como la media \pm desviación estándar calculados según la prueba: cuatro réplicas (retos de temperatura, pH, salinidad, y actividad acidificante en la leche) o tres réplicas (caracterización probiótica, actividad proteolítica y actividad lipolítica). El análisis de significancia estadística se realizó mediante una ANOVA de una vía (tiempo o cepa). Cuando fue necesario, se utilizó la prueba de Tukey para discriminar diferencias entre las medias con un nivel de significación de $P < 0.05$. Un análisis multivariado de conglomerado de observaciones se empleó para los parámetros evaluados en la sobrevivencia de las cepas de *E. faecium* de acuerdo con su similitud.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS DE *PENAEUS VANNAMEI*

Con base al análisis filogenético del marcador ADNr 16S, las cinco cepas aisladas del contenido intestinal de camarón correspondieron al orden *Lactobacillales*, y se relacionaron filogenéticamente ($>99.9\%$) con la cepa *E. faecium* (DSM 20477) (Figura 1). Estudios previos han señalado que *E. faecium* puede coexistir como microbiota del camarón proveyendo beneficios a la salud, y cuyas propiedades bioactivas y tecnológicas lo han perfilado para su uso industrial y terapéutico (Chino de la Cruz *et al.*, 2023; Zaghoul *et al.*, 2023). La ceracana relación genética de las cepas de estudio con la cepa *E. faecium* (DSM 20477) permiten sugerir su potencial probiótico, dado que previamente se ha descrito que esta cepa de referencia tiene la capacidad de producir sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) para el control de patógenos (Ng *et al.*, 2020).

CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, pH, NaCl Y ACIDIFICACIÓN DE LA LECHE

La Figura 2 ilustra el comportamiento de las cepas de *E. faecium* aisladas del contenido intestinal del camarón frente a los diferentes retos. La temperatura, el pH, y el NaCl (%) son predictores del crecimiento de las cepas de *E. faecium* ($P < 0.05$) durante el tiempo evaluado. Así mismo, la inoculación de las cepas de *E. faecium* en la leche de vaca evidencia la capacidad fermentativa de las bacterias en el periodo de evaluación ($P < 0.05$). El carácter acidificante de las cepas en la leche descremada se mostró con un valor $\Delta\text{pH} = 1.42 \pm 0.04$, y una proliferación bacteriana promedio de 9.4 ± 0.6 Log UFC/mL. El análisis multivariante indica un carácter de sobrevivencia de las cepas de *E. faecium* similar ($\approx 94\%$) y señala las siguientes condiciones hostiles o limitantes para su crecimiento: pH 3, 8% NaCl y 4 °C. Mientras que, la proliferación de las cepas fue a condiciones >15 °C, $>$ pH 5 - 7 y $<$ 6% NaCl (Figura 3).

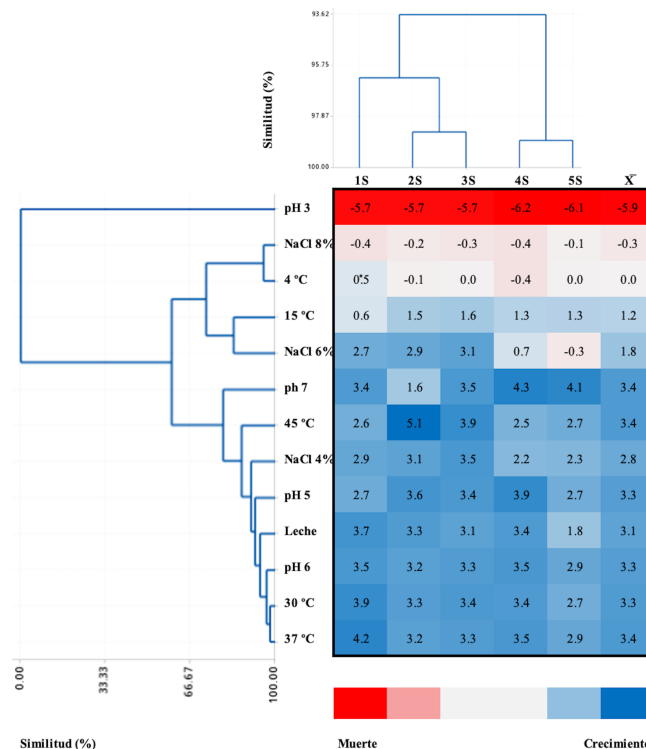


Figura 3. Perfil de sobrevivencia de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de camarón frente a diferentes retos después de 24 h de exposición. Los valores son la media aritmética (Log UFC/mL de *E. faecium*) de cuatro réplicas. La leyenda de rojo a azul indica los Log de reducción o aumento de la concentración de *E. faecium*, respectivamente

El comportamiento de las bacterias ácido-lácticas frente a diversas condiciones de temperatura, pH y salinidad ha sido ampliamente estudiado (Oussaief *et al.*, 2020; Grujović *et al.*, 2020; Sagiroglu *et al.*, 2022; Naik *et al.*, 2023). Algunos autores han descrito que, *E. faecium* tiene la habilidad de crecer en un rango de: temperatura de 4 a 45 °C, pH ácido (2 - 4) y salinidad 2 - 8% (Naik *et al.*, 2023), valores similares a los observados en nuestro estudio. La tolerancia de las cepas de *E. faecium* a condiciones diversas de temperatura, pH y salinidad permite inferir su estabilidad, crecimiento a gran escala y la capacidad de adaptación a diversos sistemas de producción de alimentos (Hanchi *et al.*, 2018).

El criterio de viabilidad en valores de pH bajo es fundamental para la selección de los probióticos que deben sortear el mecanismo de defensa del hospedero y llegar vivos al lugar de destino (Samedi & Charles, 2019). Las cepas de estudio presentaron la capacidad de sobrevivir a pH ácido (< 12 h) y proliferar a valores de 5 a 7 logaritmos, lo cual pudiera garantizar su sobrevivencia en diversos hospederos. Al respecto, se ha descrito que la tolerancia a pH 2.5 durante 4 h de cultivo es una característica deseada del probiótico para garantizar la sobrevivencia en

el tracto gastrointestinal de hombre (Ammor & Mayo, 2007). Mientras que, los camarones carecen de ácido gástrico, y su sistema digestivo tiende a tener valores de pH que van ligeramente de ácido a neutro (Imaizumi *et al.*, 2021).

Adicionalmente, el crecimiento microbiano y la acidificación de la leche por parte de las cepas de *E. faecium* (Figura 2) son indicadores del carácter fermentativo y producción de metabolitos, proponiendo su uso intencional como ingrediente para mejorar los atributos sensoriales, organolépticos, preservativos y nutritivos de los alimentos (Hanchi *et al.*, 2018). Particularmente, la actividad fermentativa de las bacterias ácido-lácticas es una propiedad atractiva debido a la conversión de los carbohidratos en metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de

hidrógeno, bacteriocinas, dióxido de carbono y diacetilo, cuyas propiedades antioxidantes y antimicrobianas han sido expuestas (Samedi & Charles, 2019, Ng *et al.*, 2020).

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA

El potencial proteolítico y lipolítico de las cepas de *E. faecium* se muestra en el Tabla 1. Todas las cepas mostraron poder proteolítico y lipofílico similar ($P > 0.05$), con un halo de 13.4 ± 1.2 mm y 15.7 ± 0.9 mm, respectivamente. El poder proteolítico y lipolítico de algunas bacterias

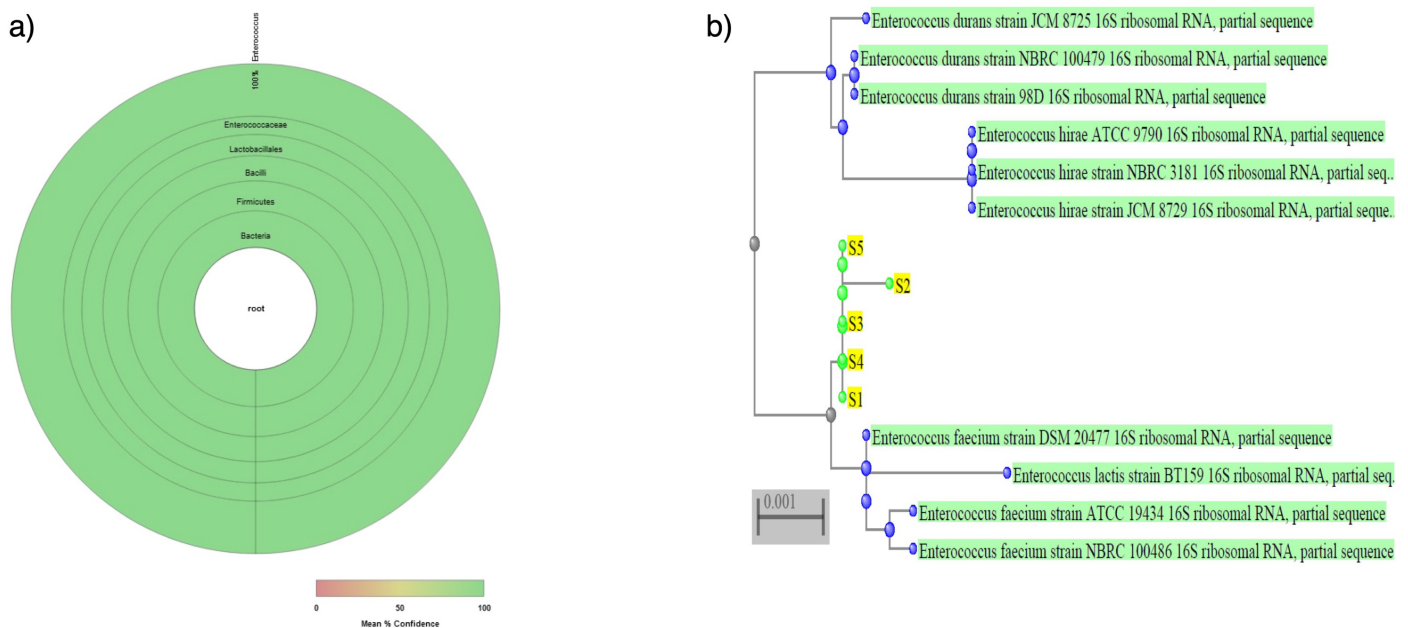


Figura 1. Identificación (a) y dendrograma de similitud (b) de las cepas ácido-lácticas aisladas del contenido intestinal de camarón mediante el análisis de secuencia de ADNr 16S. Las cepas de este estudio se indican subrayadas en amarillo.

ácido-lácticas está relacionado con la capacidad enzimática de degradar macromoléculas (proteínas o lípidos) que permitan liberar péptidos y ácidos grasos cortos que favorecen los atributos organolépticos de los alimentos fermentados y confieren propiedades bioactivas (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2021). Algunos estudios han descrito la actividad proteolítica y lipolítica de cepas de *E. faecium* aisladas de diversas fuentes, señalando que estas propiedades pueden variar entre cepas (Ammor & Mayo, 2007; Oussaief *et al.*, 2020).

CARACTERIZACIÓN PROBIÓTICA

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

La actividad antagonista de las cepas de *E. faecium* frente a los patógenos seleccionados fue dependiente de la cepa y el patógeno evaluado ($P < 0.05$) (Tabla 1). La actividad antagonista se observó frente a *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*. Mientras que, *E. coli* y *S. aureus* no fueron inhibidas por las ninguna de las cepas de *E. faecium*. La capacidad de *Enterococcus* de producir sustancias con poder antimicrobiano (ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, entre otros) es una de las características más buscadas

para su selección como probiótico (Samedi & Charles, 2019). Las enterocinas (bacteriocinas) son péptidos sintetizados por *Enterococcus* que se han identificado con bajo nivel de toxicidad y poder antimicrobiano contra microorganismo patógenos (Im *et al.*, 2023). Así mismo, las bacterias ácido-lácticas son capaces de neutralizar el crecimiento de patógenos a través de la producción de ácidos orgánicos que tienen la función de acidificar el entorno y producir la muerte celular de los patógenos (Zapašnik *et al.*, 2022). Dado el carácter antagonico de las cepas de *E. faecium* observado (Tabla 1), resulta relevante la identificación de los metabolitos que confiere esta propiedad como lo ha descrito Chino de la Cruz *et al.* (2023).

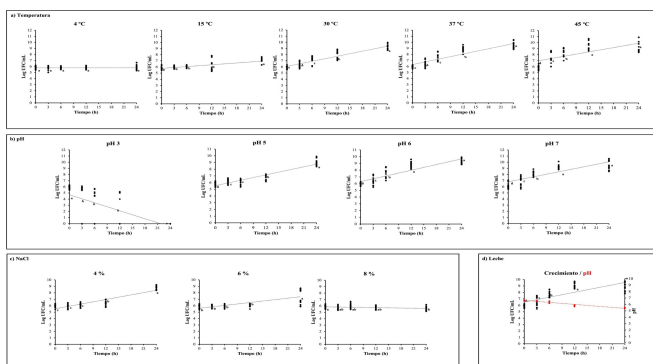


Figura 2. Curva de crecimiento de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de camarón frente a diferentes retos de temperatura (a), pH (b), salinidad (c) y acidificación y crecimiento en leche (d). Los valores son la media \pm desviación estándar de cuatro réplicas. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes por una prueba de análisis de varianza ajustada de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$.

Algunos estudios han determinado que el potencial antagonico de bacterias ácido-lácticas puede ser limitado frente a ciertos patógenos. Generalmente, se ha descrito un poder antimicrobiano mejor para bacterias patógenas Gram positivas (Soleimani *et al.*, 2023), como se observó en este estudio (Tabla 1). No obstante, el poder antagonico de cepas de *E. faecium* aisladas de diversos orígenes han sido eficientemente probadas frente a patógenos humanos (Oussaief *et al.*, 2020; Ng *et al.*, 2020; Soleimani *et al.*, 2023), fitopatógenos (Naik *et al.*, 2023), y patógenos del camarón (Chino de la Cruz *et al.*, 2023). Por lo tanto, la propiedad antagonica del *E. faecium* lo perfila como potencial biopreservativo en la industria alimentaria (Zapašnik *et al.*, 2022) o agente terapéutico (Ng *et al.*, 2020; Chino de la Cruz *et al.*, 2023).

AUTOAGREGACIÓN, COAGREGACIÓN E HIDROFOBICIDAD

En el Tabla 1 se muestran los valores de autoagregación, coagregación e hidrofobicidad de *E. faecium* aislado del contenido intestinal de camarón. La capacidad de autoagregación (7.2 – 25.1%), coagregación (32.5 – 58.1%) e hidrofobicidad (2.5 – 15.2%) variaron según la cepa en estudio ($P < 0.05$).

Algunos autores han determinado que cepas de *E. faecium* aisladas de alimentos presentaron un grado de autoagregación que oscila de $\approx 16\%$ a 50% (Oussaief *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2023; Soleimani *et al.*, 2023). La autoagregación es una propiedad de adherencia de las bacterias para mantenerse juntas y formar un consorcio simbiótico que confiere protección al estrés ambiental y la respuesta del hospedero (Han *et al.*, 2023). La autoagregación está implicada en la formación de uniones de las bacterias ácido-lácticas con el epitelio intestinal, previniendo la adherencia de patógenos y mejorando la salud del hospedero (Collado *et al.*, 2008).

La coagregación es una propiedad que refiere la capacidad de adherencia de las bacterias ácido-lácticas con microorganismo patógenos para evitar su adherencia al epitelio del hospedero (Collado *et al.*, 2007). Soleimani *et al.* (2023) señalaron que cepas de *E. faecium* aislada de alimentos presentaron valores de coagregación que oscilaron entre 30% - 60%, siendo esta propiedad variante según el probiótico o patógeno. Estos valores coinciden con lo observado en este estudio, y propone a las cepas como agentes capaces de desplazar a bacterias patógenas.

La hidrofobicidad es considerada como una de las propiedades con mayor beneficio para el uso de las bacterias ácido-lácticas (Naik *et al.*, 2023). Esta característica es un indicativo de las propiedades de la pared celular para favorecer la adherencia y colonización de estas bacterias en las células epiteliales del hospedero (Han *et al.*, 2023). La literatura ha señalado que la hidrofobicidad es una propiedad no estable ($\approx 8.7\%$ a 94%) entre las bacterias ácido-lácticas, la cual depende de la cepa evaluada o el solvente empleado (Oussaief *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2023; Naik *et al.*, 2023).

CARACTERIZACIÓN DE SEGURIDAD SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Las cinco cepas de *E. faecium* fueron susceptibles a siete antibióticos del panel evaluado, y se clasificaron en un perfil de resistencia común:

Tabla 1. Potencial probiótico y tecnológico de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de camarón

Cepa	Proteólisis (mm)	Lipólisis (mm)	Antagonismo (mm)		Autoagregación (%)	Coagregación (%)			Hidrofobicidad (%)	
			Lm	Se		Sa	Lm	Ec		Se
1S	15.2 ± 1.8	16.5 ± 4.9	4.9 ± 2.3	2.4 ± 0.1 ^{ab}	25.1 ± 0.2 ^a	53.5 ± 1.7 ^a	46.3 ± 0.4 ^b	44.6 ± 0.3 ^c	51.4 ± 1.3 ^a	2.5 ± 0.6 ^e
2S	12.7 ± 1.5	15.3 ± 1.0	5.1 ± 1.8	2.7 ± 0.4 ^a	17.0 ± 1.8 ^b	53.0 ± 1.4 ^a	45.4 ± 0.0 ^b	49.7 ± 0.7 ^b	50.4 ± 1.6 ^a	4.0 ± 0.5 ^d
3S	14.1 ± 2.8	17.2 ± 1.5	5.0 ± 1.4	2.4 ± 0.3 ^{ab}	7.2 ± 0.2 ^d	50.0 ± 1.2 ^{ab}	52.1 ± 0.2 ^a	51.9 ± 0.2 ^a	28.2 ± 2.2 ^b	5.7 ± 0.7 ^c
4S	12.3 ± 1.9	17.8 ± 1.3	2.6 ± 1.4	1.2 ± 0.5 ^b	7.6 ± 0.6 ^d	57.1 ± 1.1 ^a	55.2 ± 0.3 ^a	43.1 ± 1.0 ^d	55.8 ± 0.8 ^a	15.2 ± 0.3 ^a
5S	12.6 ± 1.4	17.6 ± 3.7	3.8 ± 2.1	1.8 ± 0.4 ^b	14.3 ± 0.7 ^c	48.2 ± 2.2 ^b	32.5 ± 0.2 ^c	51.5 ± 0.2 ^a	49.9 ± 1.5 ^a	9.8 ± 0.2 ^b
P	0.372	0.828	0.647	0.034	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000

Los valores son la media ± desviación estándar de tres réplicas. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes por una prueba de análisis de varianza ajustada de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$. El nombre de las bacterias utilizadas se representó con las siguientes siglas: *Listeria monocytogenes* (Lm), *Salmonella enterica* (Se), *Staphylococcus aureus* (Sa) y *Escherichia coli* (Ec).

Tabla 2. Actividad hemolítica y resistencia antimicrobiana de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal del camarón.

Cepa	Hemólisis	Resistencia antimicrobiana						IMR
		G	AK	S	NA	CAZ	CFP	
1S	γ	■	■	■	■	■	■	0.46
2S	γ	■	■	■	■	■	■	0.46
3S	γ	■	■	■	■	■	■	0.46
4S	γ	■	■	■	■	■	■	0.46
5S	γ	■	■	■	■	■	■	0.46

(γ): Hemólisis gamma. Las cepas de *E. faecium* se clasificaron según el mecanismo de resistencia: inhibidores de las rutas metabólicas (□), inhibidores de la síntesis de proteínas (■), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (■), e inhibidores de la síntesis de la pared celular (■). IMR: índice de multi-resistencia.

AK, NA, CAZ, G, S y CFP (**Tabla 2**). El perfil de resistencia observado en las cepas de estudio está asociado a mecanismos de inhibición de la síntesis de pared celular (cefalosporinas), proteínas (aminoglucósidos), ácidos nucleicos (quinolonas) y rutas metabólicas (sulfonamidas) (Reygaert, 2018). Las cepas presentaron un índice de multiresistencia de 0.46, lo que indica que la fuente de aislamiento se encuentra continuamente expuesta a antibióticos de acuerdo con los límites de resistencia reportados por Thenmozhi *et al.* (2014). Es reconocido el uso indiscriminado de los antibióticos en la acuicultura, y su impacto en el fenotipo de resistencia emergente en las bacterias (Amatul-Samahah *et al.*, 2020).

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana ha sido utilizada como herramienta que permite definir la evolución del fenotipo de resistencia de las bacterias ácido-lácticas, y valorar la seguridad de su uso (Im *et al.*, 2023). Particularmente, la resistencia a ampicilina, ácido nalidíxico, ceftriaxona, eritromicina, estreptomycin, kanamicina, piperacilina/tazobactam y vancomicina ha sido descrita en cepas de *E. faecium* aisladas de diversas fuentes (Oussaief *et al.*, 2020; Naik *et al.*, 2023; Zaghoul *et al.*, 2023). Chino de la Cruz *et al.* (2023) identificaron genes relacionados con la resistencia a macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclinas en el genoma de *E. faecium* aislada de camarón, lo cual es consistente con nuestras observaciones.

Algunos de los antibióticos que constituyen el fenotipo de resistencia de las cepas de estudio corresponde a cefalosporinas (CAZ y CFP), aminoglucósidos (AK y G) y sulfonamidas (G), los cuales se relacionan con una resistencia de origen intrínseco del género *Enterococcus* (Reygaert, 2018; Chino de la Cruz *et al.*, 2023). Esta cualidad favorece su potencial uso, dado el bajo riesgo de transmisión horizontal entre bacterias y su sobrevivencia en caso de un esquema terapéutico del hospedero (Oussaief *et al.*, 2020).

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Todas las cepas de *E. faecium* se clasificaron como γ -hemolíticas (Tabla 2). La seguridad de uso de cepas nativas como probióticos es uno de los aspectos más relevantes. La seguridad de cepas de *E. faecium* ha sido ampliamente debatida dado la dualidad de la bacteria para comportarse como patógeno o simbiote (Hanchi *et al.*, 2018; Zommiti *et al.*, 2022). Diversos métodos genotípicos y fenotípicos se han empleado para definir la virulencia de bacterias ácido-lácticas, incluyendo especies de *Enterococcus* (Oussaief *et al.*, 2020; Oruc *et al.*, 2021; Chino de la Cruz *et al.*, 2023; Soleimani *et al.*, 2023). Nuestros estudios son consistentes con

los de otros autores, quienes reportan la ausencia de hemólisis *in vitro* en cepas de *E. faecium* aisladas de diversos orígenes (Oussaief *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2023; Zaghoul *et al.*, 2023; Soleimani *et al.*, 2023). De Vuyst *et al.* (2004) han sustentado el uso seguro de cepas de *Enterococcus* como fermento de alimentos, dada la ausencia de la actividad hemolítica. La capacidad de hemólisis refiere la facultad de la bacteria para lisis los glóbulos rojos, por lo que la ausencia de esta propiedad en las cepas de estudio (**Tabla 2**) es al menos un indicador de su posible uso seguro.

CONCLUSIONES

El contenido intestinal del camarón es fuente de cepas *E. faecium* cuyas características fisiológicas permiten proponerlas como agentes con propiedades probióticas y tecnológicas que puedan favorecer al ambiente y la sustentabilidad de las prácticas acuícolas. Adicionalmente, la estabilidad de estas cepas frente a diferentes parámetros fisicoquímicos y la capacidad fermentativa permite proponerlas para el desarrollo de productos biotecnológicos que promuevan el crecimiento y la sanidad del camarón. Un aspecto relevante es la seguridad de uso de estas cepas, por ello la evaluación continua de la evolución de la resistencia antimicrobiana y la búsqueda intencionada de genes de virulencia son requeridos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico del personal del Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico (LiDIM) de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Abdel-Latif, H. M. R., Dawood, M. A. O., Alagawany, M., Faggio, C., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2022). Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: An updated review. *Fish & Shellfish Immunology* 122, 115-130. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.039>.
- Amatul-Samahah, M. A., Haryani, W. H., Mohd, N. F., Amal, M. N., Zamri-Saad, M. & Ina-Salwany, M. Y. (2020). Vaccination trials against

- vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports* 18(100471), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100471>
- Ammor, M. S. & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science* 76, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.022>.
- Angmo, K., Kumari, A. & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology* 66, 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>
- Castañeda-Ruelas, G. M., Fajardo López, A. J., Berrios, J. J. & Mendoza-López, I. A. (2022). Growth yield and health benefit of farm shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed in a pre-fattening phase with a diet based on wheat (*Triticum sativum*) and chickpea (*Cicer arietinum*) enriched with spirulina (*Spirulina maxima*). *Veterinaria México OA* 9, 1-14. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2022.966>
- Chino de la Cruz C.M., Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Rodríguez, M. E., Ochoa-Leyva, A. & López, A. (2023). Complete genome sequence and characterization of a novel *Enterococcus faecium* with probiotic potential isolated from the gut of *Litopenaeus vannamei*. *Microbial Genomics* 9, 1-15. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000938>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty sixth Informational Supplement, M100-S26. CLSI, EUA.
- Collado, M. C., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* 226, 1065-1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- De Vuyst, L., Foulquié, M. R. & Revest, H. (2004). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 84, 299-318. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00425-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00425-7).
- Gámez-Bayardo, S., Castañeda-Ruelas, G. M., Mora-Rochín, S., López-López, E., Valdez-González, F. J., Gutiérrez-Dorado, R. & Jiménez-Edeza, M. (2021). Nutraceutical potential of nejayote as a supplement to the conventional diet for feeding Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica* 9, 29-50.
- Grujović, M. Z., Mladenovic, K. G. & Comić, L. R. (2020). Tolerance of autochthonous lactic acid bacteria to different processing conditions in vitro. *Food and Feed Research* 47, 119-129. <https://doi.org/10.5937/ffr47-29426>.
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotic in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119, 917-935. <https://doi.org/10.1111/jam.1288>.
- Han, K., Park, S., Sathiyaseelan, A. & Wang, M. H. (2023). Isolation and characterization of *Enterococcus faecium* from fermented Korean soybean paste with antibacterial effects. *Fermentation* 9, 760. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080760>
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns – an update. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
- Im, E. J., Lee, H. H. Y., Kim, M. & Kim, M. K. (2023). Evaluation of *Enterococcal* probiotic usage and review of potential health benefits, safety, and risk of antibiotic-resistant strain emergence. *Antibiotics* 12, 1327. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081327>
- Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H. & Hirono, I. (2021). Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding. *Scientific Reports* 11, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89415-w>
- Krumperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 165-170. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.165-170.1983>
- Lane, D. J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing," in *Nucleic acid Technique sin Bacterial Systematics*, eds E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley and Sons, EUA.
- Lee, D., Yu, Y. B., Choi, J. H., Jo, A. H., Hong, S. M., Kang, J. C. & Kim, J. H. (2022). Viral shrimp diseases listed by the OIE: a review. *Viruses* 14, 1-62. <https://doi.org/10.3390/v14030585>
- Meng, Z., Zhang, L., Xin, L., Lin, K., Yi, H. & Han, X. (2018). Thecnological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 101, 2887-2896. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14003>.

- Mohd, M. I., Nur, S., Najeeb, N. A., Fahd, A. A. & Mohd, S. K. (2020). Evaluation of antibacterial potential of biosurfactant produced by surfactin-producing *Bacillus* isolated from selected Malaysian fermented foods. *Food Biotechnology* 34, 1-24. <https://doi.org/10.1080/08905436.2019.1710843>.
- Moslehishad, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., Ezzatpanah, H. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. *International Journal of Dairy Technology* 66, 279-285. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12017>.
- Naik, P. M. K., Naik, R. G., Naik, B. G., Nandish, M. S., Ekabote, S. D. & Sreenivasa, M. Y. (2023). Investigation on antibacterial, probiotic and plant growth promoting attributes of *Enterococcus faecium* MYSBC14 from blue cherry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 22, 439-448. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2023.04.003>.
- Ng, J. Z., Zarin, M. A., Lee, C. K., Phapugrangkul, P. & Tan, J. S. (2020). Isolation and characterization of *Enterococcus faecium* DSM 20477 with ability to secrete antimicrobial substance for the inhibition of oral pathogen *Streptococcus mutans* UKMCC 1019. *Archives of Oral Biology* 110, 104617. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104617>
- Ninawe, A. S., Sivasankari, S., Ramasamy, P., Seghal, G. & Selvin, J. (2020). Bacteriophage for aquaculture disease control. *Aquaculture International* 28, 1925-1938. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00567-4>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2022). Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Disponible en: <https://www.fao.org/3/cc0461es/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture.html>. 07 de septiembre, 2024.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Disponible en: <https://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>. 07 de septiembre, 2024.
- Oruc, O., Cetin, O., Darilmaz, D. O. & Yüsekdog, Z. (2021). Determination of the biosafety of potential probiotic *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional white cheeses. *LWT – Food Science and Technology* 148, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111741>
- Oussaief, O., Jrad, Z., Sbissi, I., Nara, W., Khorchani, T. & Et-Halmi., H. (2020). *Journal of Food Process Preservation* 44, e14685. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14685>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *Microbiology* 4, 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Sagiroglu, A., Özdemir N. & Çon, A. H. (2022). Multifunctional potentials of lactic acid bacterial isolates from Turkish traditional fermented foods. *Letters in Applied Microbiology* 76, 1-14. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac012>
- Samedi, L. & Charles, A. L. (2019). Evaluation of technological and probiotic abilities of local lactic acid bacteria. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 7, 9-19. <https://doi.org/10.12691/jaem-7-1-3>.
- Santos, T. T., Ornellas, R. M. S., Arcucio, L. B., Oliveira, M. M., Nicoli, J. R., Dias, C. V., Trovatti, A. P. & Vinderola, G. (2016). Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. *LWT - Food Science and Technology* 73, 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.003>
- Soleimani, H., Shokri, R., Nami, Y., Khandaghi, J. & Panahi, B. (2023). Potential probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from Duimaj, an Iranian traditional snack food, using biochemical, molecular and computational approaches. *LWT* 184, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115091>.
- Terzic-Vidojevic, A., Veljovic, K., Popovic, N., Tolinacki, M. & Golic, N. (2021). *Enterococci* from raw-milk cheeses: current knowledge on safety, technological, and probiotic concerns. *Foods* 10, 2753. <https://doi.org/10.3390/foods10112753>
- Thenmozhi, S., Rajeswari, P., Suresh, T., Saipriyanga, V. & Kalpana, M. (2014). Multi-drug resistant patterns of biofilm forming *Aeromonas hydrophila* from urine samples. *International Journal of Pharmacy Science Research* 5, 2908-2918. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(7\).2908-18](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(7).2908-18)
- Wikumpriya, G. C., Prabhatha, M. W. S., Lee, J., Kim, C. H. (2023). Epigenetic modulations for prevention of infectious diseases in shrimp aquaculture. *Genes* 14, 1-26. <https://doi.org/10.3390/genes14091682>

- Zaghloul, E. H., Abuohashish, H. M., El Sharkawy, A. S., Abbas, E. M., Ahmed, M. M. & Al-Rejaie, S. S. (2023). Probiotic potential of the marine isolate *Enterococcus faecium* EA9 and in vivo evaluation of its antiseptis action in rats. *Marine Drugs* 21, 2-19. <https://doi.org/10.3390/md21010045>
- Zapaśnik, A., Sokołowska, B. & Bryła, M. (2022). Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods* 11, 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>.
- Zommiti, M., Chevalier, S., Feuilleley, M. G. & Connil, N. (2022). Special Issue "Enterococci for Probiotic Use: Safety and Risk": Editorial. *Microorganisms* 10, 604. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030604>