

Actividad anti-*Listeria* de *Enterococcus* spp aislados de caracol de jardín (*Helix aspersa* Müller)

Anti-*Listeria* activity of *Enterococcus* spp isolated from garden snail (*Helix aspersa* Müller)

Romina B. Parada¹, Débora L. Andoro¹, Emilio R. Marguet¹, Marisol Vallejo^{1,2}

RESUMEN

En este estudio se investigó la actividad antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* aisladas del contenido intestinal del caracol de jardín (*Helix aspersa* Müller) mediante el ensayo de difusión en agar. Entre los 90 aislamientos obtenidos, 37 exhibieron actividad inhibitoria contra una o más cepas de *Listeria* ensayadas. Sobre la base de la mayor actividad, se seleccionaron 16 cepas de enterococos para posteriores estudios. Ninguna de las cepas exhibió β -hemólisis o actividad de gelatinasa y todas resultaron sensibles a la vancomicina. El tratamiento con lisozima y catalasa no afectó la actividad anti-*Listeria*; por otra parte, la actividad enzimática de la tripsina abolió la actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células (SLC), confirmando la naturaleza proteica de los compuestos activos. En todos los casos, la actividad de los SLC permaneció estable después del tratamiento térmico (100 °C, 10 min). Estas características están de acuerdo con bacteriocinas de tipo II producidas por bacterias ácido-lácticas. Entre los 16 aislados seleccionados se lograron identificar mediante pruebas bioquímicas a nueve cepas como *E. avium*, cinco como *E. mundtii* y dos como *E. faecium*. La mayor actividad se presentó en cepas de *E. mundtii* con valores entre 163 840 y 327 680 unidades arbitrarias/ml (UA/ml). Los resultados sugirieron que los caracoles de jardín podrían ser una fuente adecuada para el aislamiento de cepas de *Enterococcus* bacteriogénicos con potenciales aplicaciones tecnológicas, bioconservación de alimentos o como probióticos.

Palabras clave: Mollusca, enterococos bacteriocinogénicos, *Listeria*

¹ 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

² E-mail: soltrelew@gmail.com

El trabajo fue financiado con fondos otorgados por la Secretaría de Ciencia y Técnica – UNPSJB

Recibido: 4 de agosto de 2019

Aceptado para publicación: 8 de mayo de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

ABSTRACT

In this study, the antimicrobial activity of *Enterococcus* strains isolated from the gut content of garden snail (*Helix aspersa* Müller) was investigated by agar diffusion assay. Among the 90 isolates obtained, 37 exhibited inhibitory activity against one or more of the *Listeria* strains tested. Based on the highest activity, 16 enterococci strains were selected for further studies. None of these strains exhibited beta-hemolysis or gelatinase activity and all were sensitive to vancomycin. Treatment with lysozyme and catalase did not affect the anti-*Listeria* activity. Moreover, the enzymatic activity of trypsin abolished the inhibitory action of the cell-free supernatants (CFS), confirming the protein nature of the active compounds. In all cases CFS activity remained stable after heat treatment (100 °C, 10 min). These characteristics described agree with bacteriocin type II of lactic acid bacteria. Among the 16 selected isolates, biochemical test allowed the identification of nine *E. avium* strains, five of *E. mundtii* and two of *E. faecium*. The highest activity was observed in *E. mundtii* strains with values between 163 840 to 327 680 arbitrary units/ml (UA/ml). These results suggested that garden snails could be a suitable source for the isolation of bacteriocinogenic *Enterococcus* strains with potential technological applications, food biopreservation or probiotics.

Key words: Mollusca, bacteriocinogenic enterococci, *Listeria*

INTRODUCCIÓN

El caracol de jardín es un molusco gasterópodo perteneciente al Orden Pulmonados, Suborden Estilomatóforos, familia Helicidos. Las especies de caracol *Helix aspersa* Müller, *H. pomatia* Linné y *H. lucorum* Linné se caracterizan por la coloración de la concha (Cuellar y Cuellar, 2002; Pereyra *et al.*, 2003). *H. aspersa* es el caracol terrestre de mayor uso en la crianza por su gran prolificidad y adaptación a diversos climas (García Vera, 2016).

Los gasterópodos terrestres se alimentan de productos vegetales, de allí que necesitan de una variedad de enzimas que les permita la digestión de polisacáridos complejos. La dependencia de los gasterópodos pulmonados con la actividad microbiana del intestino explicaría su extraordinaria eficiencia en la digestión de la fibra vegetal (60-80%) (Charrier y Daguzan, 1980). La microbiota intestinal es un ecosistema com-

plejo, y juega un rol importante en el mantenimiento de la salud del hospedador, contribuyendo con el sistema inmunitario y su metabolismo. La población microbiana del intestino es dinámica y fluctúa en respuesta a cambios en la dieta y estrés ambiental; sin embargo, es frecuente que una subpoblación de microorganismos conocido como el microbioma intestinal central permanezca estable en individuos que forman parte de una población (Dar *et al.*, 2017).

Trabajos previos han demostrado que, dentro de las bacterias cultivables del tracto digestivo de los caracoles predominan las enterobacterias (Lesel *et al.*, 1990; Watkins y Simkiss, 1990) y los enterococos (Charrier *et al.*, 1998). Debido a su importancia epidemiológica, la mayor parte de los estudios taxonómicos del género *Enterococcus* han sido realizados en cepas provenientes de muestras clínicas. Sin embargo, hay un interés creciente por el estudio de microorganismos provenientes de medios externos y ambientes no tradicionales (Svec *et al.*,

2002). Esta búsqueda se ve inducida por la necesidad de encontrar cepas con características metabólicas particulares que permitan su utilización en biotecnología.

El género *Enterococcus* ha cobrado relevancia en los últimos años debido a la producción de bacteriocinas, péptidos de origen ribosomal con actividad inhibitoria contra especies Gram positivas relacionadas, utilizadas con éxito para el control o inhibición de patógenos y/o contaminantes de alimentos (Alvarez-Cisneros *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2015). El objetivo del presente trabajo fue aislar, caracterizar y evaluar la actividad anti-*Listeria* de cepas de *Enterococcus* provenientes del intestino de caracoles de jardín (*Helix aspersa*), así como evaluar sus potenciales factores de virulencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas

Las cepas del estudio se aislaron a partir del intestino de caracoles de jardín (*Helix aspersa*) recolectados entre octubre y diciembre de 2018 en la ciudad de Punta Alta, provincia de Buenos Aires-Argentina. Los caracoles se anestesiaron, sacrificaron y mediante pinzas se les retiró el caparazón. Las muestras se tomaron con hisopos estériles a partir del contenido intestinal y fueron sembradas en caldo de púrpura bromo-cresol azida (Merck, Alemania) durante 24 h a 37 °C para su enriquecimiento. Los cultivos líquidos se repicaron a agar bilis-esculina (Merck, Alemania) suplementado con ácido nalidíxico (20 µg/ml) y nistatina (10 µg/ml) y se incubaron 24-48 h a 37 °C. Se realizaron sucesivos repiques hasta obtener colonias puras que fueron conservadas a -30 °C en el Ceparío del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (Sede Trelew) de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.

Identificación Fenotípica

La identificación preliminar de las cepas conservadas se realizó mediante la colocación de Gram, ensayo de la actividad catalasa y oxidasa, crecimiento a 45 y 10 °C y actividad de pirrolidonil aminopeptidasa (Pyr-A-Enterococos, Britania). La identificación fenotípica a nivel de especie de las cepas que exhibieron actividad anti-*Listeria* se realizó mediante pruebas bioquímicas y fermentación de azúcares, según las recomendaciones de Manero y Blanch (1999).

Actividad Hemolítica y Gelatinasa

La actividad hemolítica se evaluó en agar cerebro-corazón (Britania, Argentina) suplementado con sangre desfibrinada humana (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 las colonias (β -hemólisis).

La actividad gelatinasa se realizó en agar tripticasa soja (TS) (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 (Kanemitsu *et al.*, 2001).

Resistencia a Vancomicina

Para la búsqueda de microorganismos con potencial resistencia se utilizó el agar TS suplementado con vancomicina (6 µg/ml) según las recomendaciones de Domig *et al.* (2003). Todas las cepas conservadas se repicaron a caldo TS y los cultivos se ajustaron a 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente, las placas se inocularon con 5 µl de cada cultivo y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó desarrollo de las colonias.

Producción de Exopolisacáridos

La producción de exopolisacáridos (EPS) 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.

Actividad Inhibitoria

La actividad inhibitoria se determinó luego de cultivar las cepas de enterococos conservadas en caldo Man Rogosa Sharp (MRS) (Biokar, Francia) durante 18-20 h a 37 °C. Luego del periodo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 8000 g a 4 °C durante 5 min. Los sobrenadantes libres de células (SLC) se neutralizaron con NaOH 0.5 M (Anedra, Argentina) y se sometieron a un calentamiento de 100 °C durante 10 min. La determinación de la actividad contra cepas de *Listeria innocua* ATCC 33090, *L. innocua* Tw67, *L. monocytogenes* ATCC 4677, *L. monocytogenes* Scott A y *L. monocytogenes* 1908 de los SLC se realizó por el método de difusión en placa, según lo descrito por Vallejo *et al.* (2014). El efecto antimicrobiano se expresó en mm, midiendo el halo de inhibición de crecimiento con un micrómetro (Starrett, USA).

Caracterización del Principio Activo

La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo determinando la actividad residual luego de tratar los SLC durante 2 horas con tripsina (1 mg/ml), lisozima (1 mg/ml) y catalasa (2 mg/ml) en las condiciones óptimas para cada enzima. La actividad residual en todos los ensayos se determinó por el procedimiento previamente descrito.

Título de la Actividad Inhibitoria

La determinación cuantitativa de la actividad anti-*Listeria* se realizó por el método de difusión en placa, mediante la dilución

seriada de los SLC de las cepas que presentaron un halo inhibitorio ≥ 15 mm contra *Listeria innocua* Tw67. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/ml. Las unidades arbitrarias (UA) equivalen a la inversa de la mayor dilución con actividad antimicrobiana (halo de inhibición), dividido por los mililitros de sobrenadante sembrados (UA = 1/dilución/ml sembrados).

RESULTADOS

El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo a partir de 105 ejemplares de caracoles de jardín (*H. aspersa*) recolectados durante la primavera, estación del año que corresponde con la fase en que los caracoles se alimentan y presentan mayor actividad. Se aislaron 90 cepas pertenecientes al género *Enterococcus*, las que presentaron los rasgos fenotípicos que lo distinguen de otros cocos Gram positivos (catalasa negativa y anaerobios facultativos).

Solo ocho aislamientos exhibieron actividad gelatinasa, mientras que ninguno presentó actividad hemolítica ni resistencia a vancomicina. La producción de EPS se detectó de forma cualitativa en 49 cepas. Asimismo, 37 aislados presentaron actividad inhibitoria contra una o más cepas de *Listeria* (Cuadro 1) y no exhibieron ningún factor de virulencia ensayado. El tratamiento enzimático con catalasa y lisozima no alteró la actividad antagonista ejercida por los SLC, pero el tratamiento con tripsina abolió por completo la capacidad inhibitoria.

Se seleccionaron 16 cepas sobre la base de su mayor actividad anti-*Listeria* (halos de inhibición ≥ 15 mm). Para tal fin, se evaluó la actividad inhibitoria de los SLC frente a *L. innocua* Tw67 de forma semi-cuantitativa, determinando las UA/ml. La mayor actividad anti-*Listeria* se determinó en las cepas pigmentadas, correspondiendo a la especie *E. mundtii*, mientras que las restantes cepas, pertenecientes a las especies *E. faecium* y

Cuadro 1. Actividad anti-Listeria de cepas de *Enterococcus* spp

Cepas productoras	Cepas indicadoras				
	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	<i>L. innocua</i> Tw67	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 4677	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	<i>L. monocytogenes</i> 1908
EC-802	+++	+++	+++	+++	+++
EC-803	-	+	-	-	-
EC-805	-	+	-	-	+
EC-807	+++	+++	+++	+++	+++
EC-871	+	+	+	+	+
EC-891	+++	+++	+++	+++	+++
EC-893	+	+	+	+	+
EC-894	+++	+++	+++	+++	+++
EC-895	-	+	-	-	+
EC-897	+	+	+	+	-
EC-899	-	++	+	+	+
EC-901	+	++	+	+	++
EC-903	+	+	+	+	-
EC-905	-	+	-	-	-
EC-906	-	+	-	-	-
EC-909	+	+	+	+	+
EC-935	++	++	++	++	++
EC-937	-	++	+	+	++
EC-938	+++	+++	+++	+++	+++
EC-939	-	++	++	++	++
EC-941	-	+	-	-	+
EC-942	+	++	++	++	+
EC-943	++	++	+	+	+
EC-944	+	+	+	+	+
EC-946	++	++	+	+	++
EC-950	++	++	++	++	++
EC-953	+	+	++	++	++
EC-954	++	+	-	-	++
EC-958	++	++	++	++	++
EC-959	+	+	+	+	+
EC-960	-	+	-	-	+
EC-961	-	+	-	-	++
EC-962	-	+	-	-	+
EC-963	+	+	+	+	+
EC-964	+	+	+	+	++
EC-965	++	+	++	++	+
EC-969	+++	+++	+++	+++	+++

Halo de inhibición: +: ≥ 10 mm; ++: ≥ 15 mm; +++: ≥ 20 mm; - sin inhibición

Cuadro 2. Título de la actividad inhibitoria frente a *Listeria innocua* Tw67

Cepas	Identificación fenotípica	Actividad (UA/ml)
EC-802	<i>E. mundtii</i>	327,680
EC-807	<i>E. mundtii</i>	327,680
EC-891	<i>E. mundtii</i>	163,840
EC-894	<i>E. mundtii</i>	327,680
EC-899	<i>E. faecium</i>	2,560
EC-901	<i>E. faecium</i>	2,560
EC-935	<i>E. avium</i>	1,280
EC-937	<i>E. avium</i>	1,280
EC-938	<i>E. avium</i>	1,280
EC-942	<i>E. avium</i>	2,560
EC-943	<i>E. avium</i>	1,280
EC-946	<i>E. avium</i>	1,280
EC-950	<i>E. avium</i>	5,120
EC-958	<i>E. avium</i>	5,120
EC-959	<i>E. avium</i>	5,120
EC-969	<i>E. mundtii</i>	327,680

E. avium exhibieron títulos de actividad inferiores. Los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 2.

DISCUSIÓN

Los enterococos, juntos con las bacterias Gram negativas usualmente forman parte de la microbiota de una gran variedad de animales, entre ellos los herbívoros. Dentro de los microorganismos cultivables provenientes de caracoles, a las enterobacterias y los enterococos se los relaciona generalmente con ambientes «entéricos», pero solo unos pocos residen de forma permanente en el intestino de los animales (Charrier *et al.*, 1998).

Los 90 aislamientos de *Enterococcus* obtenidos a partir de 105 muestras de contenido intestinal ponen de manifiesto la alta frecuencia con que se encuentran estas bacterias en los caracoles. Estos resultados concuerdan con trabajos previos (Charrier *et al.*, 2006; Koleva *et al.*, 2015; Dar *et al.*, 2017), en los cuales se destaca la presencia de bacterias lácticas (BL), en particular especies del género *Lactococcus* y *Enterococcus*.

Dentro de las BL, los enterococos no son microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, del inglés *generally recognized as safe*) por la Food and Drug Administration (FDA) y se los considera patógenos oportunistas para los humanos, debido a que pueden persistir en el ambiente hospitalario y provocar infecciones en personas inmunodeprimidas o con enfermedades subyacentes graves. Los enterococos constituyen la tercera causa más común de infección nosocomial (12% del total) (Abriouel *et al.*, 2008).

Entre los factores de virulencia a evaluar, se destaca la producción de gelatinasa, actividad hemolítica y resistencia a vancomicina, características que aumentan la patogenicidad de las cepas y tienen importancia clínica. La actividad gelatinasa se detectó en una baja frecuencia (8/90), resultados que contrastan con los hallados en trabajos previos (Eaton y Gasson, 2001; Kanemitsu *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011; Semedo *et al.*, 2003; Ledesma *et al.*, 2015), donde se encontró una alta frecuencia de aislamientos de enterococos provenientes de alimentos fermentados y de aves silvestres.

Dentro del ambiente intestinal, las cepas del género *Enterococcus* son consideradas como organismos beneficiosos para los huéspedes, porque forman una estructura similar a una biopelícula en el epitelio, lo que evitaría que el intestino sea colonizado por microorganismos patógenos (Shao *et al.*, 2014; Dar *et al.*, 2017). La producción de

EPS fue fenotípicamente evaluada en todos los aislamientos, detectándose en más del 50% de las cepas (49/90). La producción de EPS por parte de las BL desempeña un papel destacado en la elaboración de productos lácteos fermentados; y en particular contribuye a la textura, reología, sabor y estabilidad final del producto (Shene y Bravo, 2006). Por otra parte, la producción de estas sustancias está relacionada con la capacidad de formar biofilm y permitir la colonización, incrementando la residencia de los microorganismos en el intestino (Parra Huerta, 2010).

Otro rasgo de interés que presentan los miembros de este grupo bacteriano es la producción de péptidos antimicrobianos, con fuerte actividad anti-*Listeria*, denominados en forma general como enterocinas. Los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición contra cepas del género *Listeria* demuestran una alta frecuencia en las cepas aisladas (37/90), destacándose *E. mundtii* con títulos de actividad inhibitoria elevados (163 840–327 680 UA/ml). A diferencia de trabajos previos (Charrier *et al.*, 1998; Švec *et al.*, 2002), en los cuales se demuestra la presencia de especies pigmentadas (*E. casseliflavus* y *E. flavescens*), en este estudio en particular se identificaron cepas de *E. mundtii*, *E. faecium* y *E. avium* bacteriocinogénicas. Si bien se han aislado cepas de estas especies en seres humanos y animales de cría y domésticos, las citadas especies son particularmente poco frecuentes en este tipo de nicho.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización preliminar confirman que la actividad antimicrobiana de los SLC no es ejercida por el peróxido de hidrógeno, son de naturaleza proteica y no presentan azúcares en su estructura, características compatibles con sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas. En todos los casos estudiados, la estabilidad térmica indicaría que se trata de péptidos de bajo peso molecular con actividad anti-*Listeria*, propiedades que permiten incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

En la actualidad, existen una gran cantidad de trabajos donde se destaca la producción de péptidos bioactivos por parte de cepas de *E. mundtii* aislados de diversos hábitats y sus potenciales aplicaciones en biopreservación de alimentos y/o como probióticos (Schelegueda *et al.*, 2015; Grau *et al.*, 20017; Vallejo *et al.*, 2018; Delcarlo *et al.*, 2019). Sin embargo, no hay antecedentes del aislamiento de especies de *E. mundtii* bacteriocinogénicas a partir de caracoles de jardín.

Todas las cepas de enterococos que exhibieron actividad anti-*Listeria* presentaron además producción de EPS. Ambos rasgos podrían tener un efecto sinérgico que probablemente impida el ingreso y establecimiento de microorganismos patógenos en el intestino del caracol, manteniendo el equilibrio ecológico. También se debe considerar que ninguna de las 16 cepas seleccionadas exhibió alguno de los factores de virulencia evaluados.

CONCLUSIONES

Durante los últimos años ha despertado especial interés la búsqueda de microorganismos con capacidades biotecnológicas aplicables a la producción de bienes y servicios. En particular, la industria alimenticia, inducida por los consumidores, ha tratado de ofertar productos cada vez más seguros y evitando el uso de conservantes químicos. Las cepas bacteriocinogénicas y las bacteriocinas han sido utilizadas con éxito en diversos modelos y se vislumbran como posibles alternativas. En el caso de este trabajo se seleccionaron 16 cepas del contenido intestinal de caracoles con capacidad inhibitoria, y dentro de este grupo de destacaron las cepas de *Enterococcus mundtii* con actividades entre 163 840 y 327 680 UA/ml.

LITERATURA CITADA

1. **Abriouel H, Omar NB, López RL, Gálvez A. 2008.** La doble faceta del género *Enterococcus* y su importancia en alimentos. *Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient* 21: 66–74.
2. **Alvarez-Cisneros YM, Sáinz Espuñes TR, Wachter C, Fernández F, Ponce E. 2011.** Enterocins: Bacteriocins with applications in the food industry. In: Méndez-Vilas A (ed). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Spain: World Scientific. p 1331-1341.
3. **Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. 2016.** Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 2939-2951.
4. **Charrier M, Combet-Blanc Y, Ollivier B. 1998.** Bacterial flora in the gut of *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata): evidence for a permanent population with a dominant homolactic intestinal bacterium, *Enterococcus casseliflavus*. *Can J Microbiol* 44: 20-27.
5. **Charrier M, Daguzan J. 1980.** Food consumption: production and energy budget in *Helix aspersa* Müller (Gastropoda Pulmonata) *Ann Nutr Alim* 34: 147-166.
6. **Charrier M, Fonty G, Gaillard-Martinie B, Ainouche K, Andant G. 2006.** Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biol Res* 39: 669-681.
7. **Cuellar M, Cuellar R. 2002.** Producción de caracoles: bases fisiológicas, sistemas de producción y patología. 2º ed. Madrid: Mundi-Prensa. 173 p.
8. **Dar M, Shaikh A, Pawar K, Pandit R. 2017.** Gut microbiome analysis of snails: a biotechnological approach. En: Sajal Ray (ed). *Organismal and molecular malacology*. Intech. p 189-217.
9. **Delcarlo SB, Parada RB, Schelegueda LI, Vallejo M, Marguet ER, Campos CA. 2019.** From the isolation of bacteriocinogenic LAB strains to the application for fish paste biopreservation. *LWT* 110: 239-246. doi: 10.1371/journal.pone.0085948
10. **Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. 2003.** Methods used for isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol* 88: 165-188. doi: 10.1016/s0168-1605-(03)00178-8
11. **Eaton TJ, Gasson MJ. 2001.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 67: 1628-1635. doi: 10.1128/AEM.67.4.-1628-1635.2001
12. **Grau T, Vilcinskis A, Joop G. 2017.** Probiotic *Enterococcus mundtii* isolate protects the model insect *Tribolium castaneum* against *Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol* 8: 1261. doi: 10.3389/fmicb.2017.01261
13. **Kanemitsu K, Nishino T, Kunishim, H, Okamura N, Takemur, Yamamoto H, Kaku M. 2001.** Quantitative determination of gelatinase activity among Enterococci. *J Microbiol Methods* 47: 11-16. doi: 10.1016/s0167-7012(01)00283-4
14. **Koleva ZV, Kizheva YK, Tishkov SH, Dedov IK, Kirova EL, Stefanova PM, Moncheva PA, et al. 2015.** Dynamics of bacterial community in the gut of *Cornu aspersum*. *J Biosci Biotechnol* 4: 263-269.
15. **Ledesma P, Parada R., Vallejo M, Marguet ER. 2015.** Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia. *Analecta Vet* 35: 6-12
16. **Lesel M, Charrier M, Lesel R. 1990.** Some characteristics of the bacterial flora housed by the brown garden snail *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata). Preliminary results. In: *Proc International*

- Symposium on Microbiology in Poecilotherms. Amsterdam:
17. **Manero A, Blanch AR. 1999.** Identification of *Enterococcus* spp with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 65: 4425-4430.
 18. **O'Connor PM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. 2015.** Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Curr Opin Food Sci* 2: 51-57. doi: 10.1016/j.cofs.2015.01.004
 19. **Parra RA. 2010.** Review. Bacterias ácido-lácticas: papel funcional en los alimentos. *Fac Cienc Agropec* 8: 94-105.
 20. **Pereyra RL, Maiorano L, Raimondi N, Ybalo C. 2003.** La helicultura. *Invenio* 11: 127-134.
 21. **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*. *LWT* 64: 794-801. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.017
 22. **Semedo T, Santos MA, Martins P, Silvia Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Barreto Crespo MT. 2003.** Comparative study using type strains and clinical and food isolates 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
 23. **Shao Y, Arias-Cordero E, Guo H, Bartram S, Boland W. 2014.** *In vivo* Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Plos One* 9: e85948. doi: 10.1371/journal.pone.0085948
 24. **Shene C, Bravo S. 2006.** Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* for exopolisaccharide production in continuous culture. *Enzyme Microb Technol* 40: 1578-1584. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.11.003
 25. **Silva N, Igrejas G, Vaz J, Araújo C, Cardoso J, Rodrigues J, Torres C, Poeta P. 2011.** Virulence factors in enterococci from partridges (*Alectoris rufa*) representing a food safety problem. *Foodborne Pathog Dis* 8: 831-833. doi: 10.1089/fpd.2010.0781
 26. **Švec P, Devriese LA, Sedláček I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, et al. 2002.** Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspersa*. *J Appl Microbiol* 92: 951-957. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01605.x
 27. **Vera R. 2016.** Microbiología del caracol *Helix aspersa* Müller. Aplicaciones biotecnológicas para su mejoramiento sanitario con impacto en su comercialización. Tesis Doctoral. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona. 244 p.
 28. **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.
 29. **Vallejo M, Sosa F, Parada RB, Aguirre LF, Marguet ER. 2018.** Aislamiento de una cepa de *Enterococcus mundtii* bacteriocinogénico proveniente de *Hemiodema spectabilis* (pepino de mar). *Rev Inv Vet Perú* 29: 1481-1492. doi: 10.15381/rivep.v29i4.15201
 30. **Watkins B, Simkiss K. 1990.** Interactions between soil bacteria and the molluscan alimentary tract. *J Molluscan Stud* 56: 267-274. doi: 10.1093/mollus/56.2.267