

Evaluación de un método colorimétrico para el estudio de la interacción entre microorganismos y células de epitelio intestinal

A.A. HUGO, J. MINNAARD, P.F. PÉREZ*

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 116, 1900 La Plata, Argentina

*Correspondencia. Tel/fax: 54 221 424 9287/ 54 221 425 4853. E-mail: plp@nahuel.biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la aplicabilidad de la determinación colorimétrica de la actividad nitrato reductasa microbiana para estudiar la asociación de microorganismos con enterocitos humanos en cultivo (línea Caco-2). El nitrito producido luego de la incubación de las suspensiones bacterianas con una solución de nitrato-formiato fue evaluado mediante una reacción de diazotación-copulación con ácido sulfanílico y cloruro de N-naftil-etilen diamonio. Se observó una relación bifásica entre la concentración bacteriana y la concentración de nitrito producida. Esta respuesta particular podría ser atribuida al carácter sigmoideo de la cinética de reducción de nitrato y hace que sea necesaria la modificación de los métodos de cálculo. La asociación bacteriana con células Caco-2 se mostró dependiente de la cepa encontrándose los mayores valores para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para algunas cepas, los porcentajes de asociación calculados en base a la actividad nitrato-reductasa fueron significativamente mayores que los calculados en base a recuentos de microorganismos viables. Los resultados del presente trabajo muestran que la asociación de microorganismos con enterocitos humanos en cultivo puede ser evaluada a través de la medición de la actividad nitrato reductásica, siempre que para los cálculos se tengan en cuenta la relación bifásica entre la concentración bacteriana y la concentración de nitrito.

Palabras claves: nitrito, nitrato reductasa, ensayo colorimétrico, enterocitos humanos, células Caco-2, adherencia.

SUMMARY

Colorimetric method to evaluate the interaction between microorganisms and cultured human enterocytes. The aim of the present study was to gain further insight on the reliability of the colorimetric determination of the activity of bacterial nitrate reductase to evaluate bacterial concentrations and interaction between microorganisms and enterocyte-like cells. Nitrite produced after incubation of the samples with a nitrate-formate solution was determined with a diazotization reaction with sulphaniic acid and N-naphthyl-ethylene-diamonium dichloride. Cell association assays were performed with differentiated Caco-2 cells. A biphasic relationship was found between nitrite concentration and bacterial densities. This behavior seems to be due to the sigmoidal character of the kinetics of nitrate reduction. Association to Caco-2 cells was strongly strain dependent being *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 the strain showing the highest values of association. For some strains, percentages of association calculated on the basis of the colorimetric assay were significantly higher than those calculated in terms of viable counts. Bacterial association with enterocyte-like cells can be evaluated by measures of the activity of bacterial nitrate reductase provided that the biphasic relationship between bacterial and nitrite concentrations is taken into account for the calculations. Results presented in this paper show the applicability of the colorimetric method to assess the amount of microorganisms associated to human enterocytes in culture.

Key words: nitrite, nitrate reductase, colorimetric assay, human enterocytes, Caco-2 cells, adherence.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la interacción entre los microorganismos y los enterocitos es fundamental para comprender el efecto de la flora intestinal sobre el hospedador. Aunque existen varios modelos in vitro de células epiteliales intestinales humanas, las células Caco-2 constituyen uno de los sistemas más aceptados para el estudio de las interacciones entre microorganismos y enterocitos humanos (1, 8, 11).

Con respecto a los métodos utilizados para la determinación de concentraciones bacterianas, su confiabilidad, costo y duración depende del microorganismo en estudio así como también del sistema experimental empleado. Una revisión de los métodos utilizados para determinar la concentración de microorganismos (tanto en suspensión como asociados a células eucarióticas) muestra que los recuentos de bacterias viables y las lecturas espectrofotométricas se encuentran entre las técnicas más comúnmente empleadas. Asimismo se utili-

zan la marcación radioactiva, citometría de flujo, recuentos totales, PCR cuantitativa y métodos enzimáticos (4, 7, 14, 16).

Los métodos basados en alguna actividad enzimática microbiana presentan buena sensibilidad y especificidad y permiten la determinación específica de microorganismos en muestras complejas (3, 4). En particular, la capacidad de ciertos microorganismos de reducir nitrato a nitrito en la respiración anaeróbica ha sido utilizada para determinar concentraciones bacterianas y la capacidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de interactuar con células HeLa, células uroepiteliales y coágulos de fibrina (16).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la confiabilidad de la determinación colorimétrica de la actividad nitrato reductásica para la evaluación de concentraciones bacterianas y la interacción de diferentes microorganismos con células de epitelio intestinal humano en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* CM1, *Bacillus cereus* 2 y *Bacillus cereus* M2 pertenecen a la colección de cultivos de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata). Las cepas de *Salmonella* y *Shigella* fueron cedidas gentilmente por el Dr. Horacio Lopardo del Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires. Asimismo se emplearon las cepas de *Staphylococcus aureus* derivada de ATCC 25923 y *Escherichia coli* derivada de ATCC 25922. Los microorganismos fueron cultivados en caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) adicionado de 1 g/l de nitrato de sodio. Cabe destacar que la presencia de nitrato es importante para la inducción adecuada de la actividad nitrato reductasa (16). Los cultivos de *Escherichia coli*, *Salmonella arizonae*, *Shigella sonnei* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se realizaron en forma estática a 37 °C durante 18 h. Las cepas de *Bacillus cereus* se crecieron en BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 32 °C con agitación durante 18 h. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 10000 g durante 10 min y resuspendidas en PBS, sin previo lavado, hasta alcanzar la absorbancia requerida (600 nm).

Ensayo de nitrato reductasa

La actividad nitrato-reductasa se determinó mediante una reacción de diazotación del nitrito utilizando ácido sulfanílico y N-naftil-etilen-diamonio. El formiato se agregó a la solución inductora además del nitrato, debido a que la formiato deshidrogenasa está estrechamente asociada al sistema de reducción de nitratos (13). La presencia de formiato produce mayores concentraciones de nitrito que en el caso de utilizarse sólo nitrato.

Las muestras se incubaron con una mezcla de 5 partes de NaNO_3 1% (p/v) y 3 partes de formiato de sodio 1 M a 37 °C durante diferentes intervalos de tiempo, tal como se indica en las figuras correspondientes. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 1 min a 14000 g. Se extrajeron 0,1 ml de sobrenadante que fueron mezclados con 0,1 ml de ácido sulfanílico 1% (p/v) y 0,1 ml de cloruro de N-naftil-etilen-diamonio 0,02%, ambos preparados en HCl 1,5 M. La mezcla se dejó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color

y se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader SLT Rainbow Reader, Wien, Austria).

Estudios cinéticos

Diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas conteniendo alrededor de 10^8 ufc/ml se mezclaron con un volumen igual de la solución de nitrato-formiato doble concentración. Las mezclas se incubaron a 37 °C. A diferentes tiempos, las muestras fueron centrifugadas y la concentración de nitrito se evaluó como se indicó anteriormente. Para calcular la velocidad inicial de reacción, se efectuó una regresión lineal con los primeros puntos de la curva.

Cultivo de enterocitos

Se utilizaron enterocitos humanos (células Caco-2) que fueron obtenidas del Nestle Research Center (Lausanne, Suiza). Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium) con 25 mM de glucosa, 20% de suero fetal bovino (Gen S. A. Buenos Aires, Argentina) inactivado (30 min, 58 °C), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, Life Technologies, Rockville MD, USA), 12 UI/ml de penicilina, 12 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de gentamicina y 1,25 µg/ml de fungizona.

Para los ensayos de asociación, las células se inocularon en placas de 24 fosas (Iwaki Glass, Japan) a razón de $1,4 \times 10^5$ células por fosa y se incubaron a 37°C en atmósfera compuesta por 95% de aire y 5% de CO_2 . Las monocapas se utilizaron en postconfluencia tardía luego de 15 días en cultivo entre los pasajes 46 y 58.

Ensayos de asociación

Antes de los ensayos, las células fueron lavadas dos veces con PBS. Posteriormente, se agregaron 0,5 ml de las suspensiones bacterianas con alrededor de 2×10^8 ufc/ml y 0,5 ml de PBS por fosa. Las placas fueron incubadas durante 60 min a 37°C luego de lo cual se efectuaron tres lavados con 0,5 ml de PBS estéril por fosa.

La determinación colorimétrica del porcentaje de asociación se realizó de la siguiente manera: luego de los lavados y de retirar completamente el PBS, se agregaron 0,25 ml de la solución inductora (nitrato-formiato) por fosa y se incubó durante 2 h a 37 °C. Luego, las muestras fueron extraídas de las fosas, centrifugadas a 14000 g durante 1 min y 0,1 ml de cada sobrenadante fueron transferidos a una placa de 96 fosas. El desarrollo de color se realizó mediante el agregado de 0,1 ml de ácido sulfanílico 1% y 0,1 ml de cloruro de N-naftil-etilendiamonio (ambos preparados en HCl 1,5 M). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y la intensidad de color se determinó a 540 nm en un lector de placas tal como se indicó anteriormente. Para concentraciones altas de nitrito, las muestras fueron diluidas en PBS previamente a la reacción de diazotación. Suspensiones bacterianas de concentración conocida fueron tratadas de la misma manera en presencia de células Caco-2 para establecer las curvas de calibración.

Los porcentajes de asociación se calcularon como $100 \times \text{Cs}/\text{Cr}$ siendo Cs la concentración bacteriana de la muestra y Cr la concentración bacteriana patrón. La asociación se determinó también mediante recuento de microorganismos viables. Para esto, luego de la coinubación entre las bacterias y los enterocitos y posterior lavado, las monocapas fueron lisadas con agua destilada a 37 °C durante 1 h. Diluciones apropiadas se plaquearon en agar nutritivo. Los porcentajes de asociación se calcularon utilizando la cantidad total de bacterias agregadas por fosa como 100%.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y el test de Tukey para las mínimas diferencias significativas (Systat, Inc).

RESULTADOS

Determinación colorimétrica de nitrito y cinética de la actividad nitrato reductasa

La determinación colorimétrica de nitrito tiene una alta sensibilidad ya que pueden detectarse concentraciones de nitrito tan bajas como 0,58 mM y la linealidad se mantiene hasta concentraciones de 50 mM (datos no mostrados).

La determinación colorimétrica del nitrito producido en suspensiones bacterianas de diferentes concentraciones mostró una curva bifásica. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para *E. coli* CM1. Puede observarse que existe un aumento significativo de la pendiente para suspensiones bacterianas con más de 0,1 unidades de absorbancia (A_{600}). De las 7 cepas ensayadas, solamente *Bacillus cereus* M2 mostró una respuesta lineal (datos no mostrados).

Para determinar si esta respuesta bifásica estaba relacionada con la cinética de reducción de nitrato, se realizaron determinaciones de nitrito a diferentes tiempos. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos con *E. coli* ATCC 25922. Puede apreciarse que la absorbancia se incrementa con el tiempo y existe una relación sigmoidea entre el tiempo y la intensidad de color (Figura 2 A). La relación entre las velocidades iniciales de reacción y las concentraciones bacterianas se mantuvo lineal en un amplio rango de concentraciones (Figura 2 B). Idénticos resultados fueron obtenidos con *E. coli* CM1 y *S. aureus* ATCC 25923 (datos no mostrados).

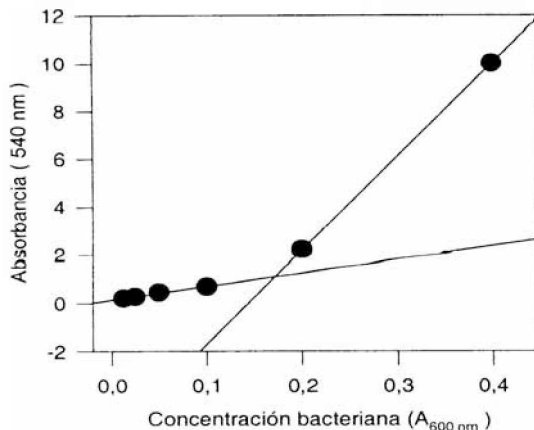


Figura 1. Relación entre la concentración bacteriana y el color desarrollado ($A_{540\text{ nm}}$) en la determinación colorimétrica de la actividad nitrato reductasa para *E. coli* CM1. Los datos representan los resultados de un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes.

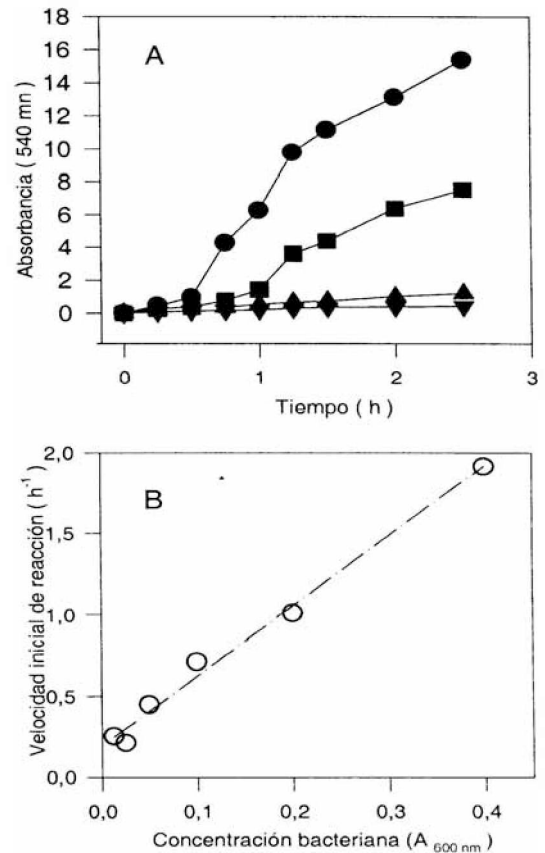


Figura 2. (A) Cinética de la reducción de nitrato para diferentes concentraciones bacterianas ($A_{600\text{ nm}}$). (B) gráficos de velocidades iniciales de reacción en función de las concentraciones bacterianas para *Escherichia coli* ATCC 25922. Las concentraciones bacterianas ($A_{600\text{ nm}}$) para cada cepa son: (\blacktriangledown) 0,05, (\blacktriangle) 0,1, (\blacksquare) 0,2 y (\bullet) 0,4. Los datos representan los resultados de un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron en por lo menos 3 experimentos independientes.

Es importante destacar que la viabilidad bacteriana no fue afectada por la solución de nitrato-formiato en todo el rango de concentraciones bacterianas ensayadas (datos no mostrados).

Asociación de microorganismos con enterocitos humanos en cultivo

Para evaluar la aplicabilidad del método colorimétrico para la cuantificación de la asociación de microorganismos a enterocitos, se incubaron suspensiones bacterianas con células Caco-2 diferenciadas y se calcularon los porcentajes de asociación según se indica en la Figura 3. Como se observa en el Cuadro 1, los más

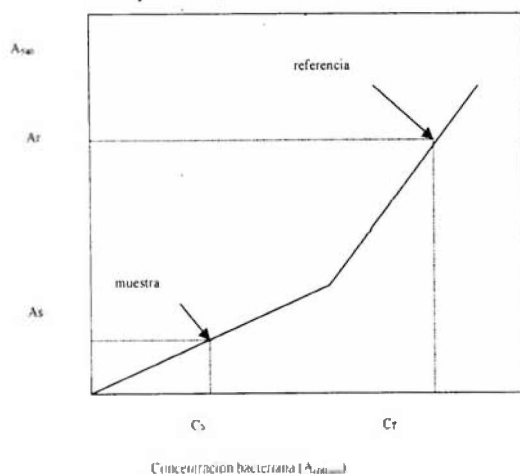


Figura 3. Ejemplo del cálculo de las concentraciones bacterianas teniendo en cuenta la relación bifásica entre las concentraciones bacterianas y el color desarrollado en la reacción de diazotación-copulación. Referencias: Ar: absorbancia (540 nm) para la suspensión bacteriana de referencia; As: absorbancia (540 nm) para la muestra; Cr: concentración bacteriana (A_{600nm}) de la suspensión de referencia y Cs: concentración bacteriana (A_{600nm}) de la muestra. El porcentaje de asociación celular se calcula como $100 \times Cs/Cr$ cuando se agrega una concentración bacteriana Cr por fosa.

Cuadro 1. Porcentaje de asociación de diferentes microorganismos luego de 1 h de incubación con células Caco-2 a 37 °C.

Cepa	Porcentaje de asociación	
	Nitrato reductasa	Recuento viable
<i>Escherichia coli</i> CM1	4,61 ± 0,29*	0,31 ± 0,08*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,56 ± 1,00*	0,05 ± 0,02*
<i>Bacillus cereus</i> 2	18,9 ± 3,8 ^b	1,2 ± 0,1 ^{ab} **
<i>Bacillus cereus</i> M2	0,7 ± 0,3*	0,16 ± 0,03*
<i>Salmonella arizonae</i>	9,6 ± 0,65*	0,55 ± 0,09**
<i>Shigella sonnei</i>	4,96 ± 0,76*	1,65 ± 0,27 ^{ab} **
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	41,7 ± 7,1 ^c	4,36 ± 1,77 ^b **

Los valores representan promedios (± desviación estándar) de 2 a 6 determinaciones en diferentes pasajes celulares. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (nitrato reductasa o recuentos) para la misma cepa. *P<0.05. **P<0.001. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas entre cepas para el mismo tratamiento (P<0,05).

altos porcentajes de interacción se obtuvieron para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ya que esta cepa mostró 41,7 % de asociación. En contraste, solamente 0,7 % de la cepa M2 de *Bacillus cereus* permaneció asociada a las células. Cuando la asociación se calculó en base a los recuentos de bacterias viables, los valores

variaron entre 0,05% y 4,36% (Cuadro 1). Para algunas cepas, los porcentajes de asociación calculados en base a la actividad nitrato reductasa fueron significativamente mayores que los calculados en base a recuentos de bacterias viables. Esto ocurrió para *Escherichia coli* CM1, *Bacillus cereus* 2, *Salmonella arizonae* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

De acuerdo a resultados publicados (16), existe una relación lineal entre la concentración de nitrato y la concentración bacteriana en el ensayo colorimétrico de la actividad nitrato reductasa. Este comportamiento permite el cálculo directo de la concentración bacteriana utilizando las relaciones entre la absorbancia de las muestras y la de suspensiones de concentración bacteriana conocida. En estas condiciones, Cs/Cr será igual a As/Ar (Figura 3).

Sin embargo, en el presente trabajo se ha demostrado una relación bifásica entre la cantidad de color y la concentración bacteriana (Figura 1), lo cual da lugar a dos zonas correspondientes a bajas y altas concentraciones bacterianas. Resulta evidente en la Figura 3, que las relaciones Cs/Cr y As/Ar son diferentes entre sí cuando existe la mencionada curva bifásica y que las muestras y las suspensiones bacterianas de concentración conocida (referencia) se encontrarán en zonas diferentes de la curva.

Aunque se encuentra una relación lineal entre las velocidades iniciales de reacción y las concentraciones bacterianas en todo el rango de concentraciones ensayadas (Figura 2), el cálculo de las concentraciones bacterianas en base a las velocidades iniciales de reacción constituye un método engorroso y lento. Es aconsejable por lo tanto, asumir el carácter bifásico de las curvas de calibración y realizar el cálculo a partir de las relaciones entre las concentraciones bacterianas y la concentración de nitrato producida.

Según se observa en la Figura 3, el porcentaje de asociación será $100 \times Cs/Cr$. El carácter bifásico de las curvas de calibración podría explicarse teniendo en cuenta el curso sigmoideo de la reacción de reducción. Como puede apreciarse en la Figura 2, a un tiempo fijo, las distancias entre las curvas dependen de la concentración bacteriana.

Esta cinética de reacción podría ser debida a la coexistencia de diferentes sistemas relacionados con la reducción de nitrato en las bacterias. En efecto, varios mecanismos pueden tomar parte de las vías de reducción de nitrato y también existen diferentes posibilidades de regulación (5, 12, 13). Estos sistemas pueden coexistir en la misma bacteria y podrían tener diferentes actividades relativas según la concentración bacteriana.

En referencia a los ensayos de interacción con células Caco-2, debe destacarse que el término "asociación"

utilizado en todo este trabajo tiene en cuenta tanto las bacterias adheridas como las internalizadas. Aunque se sabe de la capacidad de invasión de células epiteliales intestinales por parte de microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp y *Bacillus cereus* (1, 2, 6, 9, 10, 15), nuestros estudios no discriminan entre bacterias adheridas (en la superficie) y bacterias internalizadas. La incubación de las monocapas infectadas con la solución de nitrato-formiato produce una lisis total de las células epiteliales y permite el contacto de todas las bacterias con la solución inductora.

Tal como se muestra en el Cuadro 1, los valores de asociación dependen del método empleado. Las diferencias podrían ser atribuidas a la coagregación entre las bacterias y restos celulares ya que, luego del desprendimiento de las células de la superficie de la placa de cultivo, se observan agregados de bacterias y restos celulares a pesar de haberse realizado agitación vigorosa de las suspensiones antes de los recuentos de bacterias viables (datos no mostrados). Esta interacción fue diferente en las distintas cepas ensayadas. Queda claro que un agregado dará una sola colonia en un recuento en placa, independientemente del número de microorganismos que lo componen.

Estos hallazgos podrían explicar los diferentes valores de asociación encontrados con los métodos estudiados (Cuadro 1). Por ejemplo, cuando se empleó el método colorimétrico, los valores de asociación fueron significativamente mayores para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que para *Shigella sonnei* ($P < 0,05$) mientras que no se obtuvieron diferencias cuando se evaluaron mediante recuentos de bacterias viables.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la actividad nitrato-reductasa bacteriana puede ser usada para determinar concentraciones de microorganismos así como también para estudiar la asociación entre microorganismos y enterocitos humanos, siempre que se preste especial atención a la posibilidad de una relación bifásica entre la concentración bacteriana y la intensidad de color desarrollado que presentan algunos microorganismos. Además, la formación de agregados bacterianos no modifica los resultados. Finalmente, como no es necesario un lavado de los microorganismos antes del ensayo, este método no implica la remoción de estructuras superficiales involucradas en las interacciones procarionte-eucariote.

Agradecimientos: Este trabajo fue parcialmente financiado por subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 1154) y la International Foundation for Science (Grant E/2977-1, Suecia). A. A.H. es becaria del Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), J.M. es becaria de la Universidad Nacional de La Plata y P.F.P. es miembro de la Carrera de Investigador Científico y Tecnológico del CONICET. Los autores desean expresar también su agradecimiento al Dr. Horacio Lopardo por las ce-

pas de *Salmonella* y *Shigella* y a la Sra. Lucia Brandy por la asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Bernet M F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1993) Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4121-4128.
- Bernet M F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1994) *Lactobacillus acidophilus* La1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35: 483-489.
- Bibiloni R, Pérez PF, De Antoni GL (2000) An enzymatic-colorimetric assay for the quantification of *Bifidobacterium*. *J. Food Prot.* 63: 322-326.
- Bibiloni R, Gómez Zavaglia A, De Antoni GL (2001) Enzyme-based most probable number method for the enumeration of *Bifidobacterium* in dairy products. *J. Food Prot.* 64: 2001-2006.
- Bonnefoy V, Demoss JA (1994) Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 66: 47-56.
- Cocconnier MH, Llievin V, Lorrot M, Servin AL (2000) Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1152-1157.
- Comas-Riu J, Vives-Rego J (2002) Cytometric monitoring of growth, sporogenesis and spore cell sorting in *Paenibacillus polymyxa* (formerly *Bacillus polymyxa*). *J. Appl. Bacteriol.* 92: 475-481.
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 59: 221-226.
- Guignot J, Bernet-Camard MF, Poüs C, Plançon L, Le Bouguenec C, Servin AL (2001) Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for $\alpha_5\beta_1$ integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. *Infect. Immun.* 69: 1856-1868.
- Kusters JG, Mulders-Kremers GAW M, van Doornik CEM, van der Zeijst B A M (1993) Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 61: 5013-5020.
- Minnaard J, Humen M, Pérez PF (2001) Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cells. *J. Food Prot.* 64: 1535-1541.
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J. Bacteriol.* 181: 6573-6584.
- Payne WJ (1973) Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Microbiol. Rev.* 37: 409-452.
- Pérez PF, Minnaard J, Disalvo EA, De Antoni GL (1998) Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 21-26.
- Rowan NJ, Deans K, Anderson JG, Gemmill CG, Hunter IS, Chaitong T (2001) Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3873-3881.
- Shoeb HA, Tawfik AF, Shibi AM (1991) A nitrate reductase-based colorimetric assay for the study of bacterial adherence. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 270-276.