

- Reseña -

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO AISLADAS A PARTIR DE MATRICES ALIMENTARIAS

Tatiana Beldarraín*, Anabel González y Danae Kala

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, Carretera al Guatao, km 3 1/2,

La Habana, C.P. 19 200, Cuba.

E-mail: tatiana@iia.edu.cu

RESUMEN

En este trabajo se recopiló información actualizada acerca de técnicas bioquímicas y moleculares de identificación de bacterias acidolácticas a partir de matrices alimentarias, sus perspectivas y limitaciones.

Palabras clave: identificación, bacterias ácido lácticas, técnicas moleculares, PCR.

ABSTRACT

Methods of identification of lactic acid bacteria isolated of foods

Information about biochemical and molecular techniques used in lactic acid bacteria in food matrix were compiled and their perspectives and limitations were discussed.

Key words: identification, lactic acid bacteria, molecular techniques, PCR.

INTRODUCCIÓN

La microbiología de los alimentos se ha enfocado, principalmente, al estudio de la sobrevivencia de microorganismos patógenos, de descomposición o a la actividad de algunos de los que son fermentadores. Sin embargo, para entender su presencia y crecimiento en los alimentos se reconoce, en la actualidad, la importancia de su estudio con un enfoque ecológico (1-4).

Tradicionalmente, los microorganismos se han identificado de acuerdo a su fenotipo pero para ello se requiere del aislamiento y cultivo de los mismos. Esta necesidad ha limitado la comprensión de la diversidad

microbiana, pues 90 % de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden cultivarse empleando las técnicas tradicionales (5). En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de los géneros microbianos presentes en las comunidades complejas debido al empleo de métodos moleculares y de herramientas utilizadas en estudios filogenéticos para identificarlos.

El hombre antiguo aprendió a producir los alimentos fermentados por el método de ensayo y error. Estos contenían una microbiota natural, de ahí que sus características y las condiciones de almacenamiento determinaban el predominio de algunos de sus miembros. Los alimentos fermentados contienen, por lo general, microbiotas complejas que son difíciles de estudiar experimentalmente. El empleo de las técnicas moleculares permite describir, monitorear y controlar comunidades microbianas para que lleven a cabo la fermentación y mantener la estabilidad del producto final (1).

***Tatiana Beldarraín Iznaga:** Licenciada en Microbiología (U.H., 1996). Especialista en Carne y Productos Cárnicos (IIIA, 1999). Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (IFAL, 2006). Investigador Agregado del grupo de Ciencias de la Vicedirección de Carne. Labora en la Calidad Microbiológica de Productos Cárnicos e Higiene de Plantas Procesadoras de Alimentos.

Métodos para la determinación de la estructura de comunidades microbianas

Una alternativa para la determinación de la estructura microbiana de los alimentos fermentados es aislar los microorganismos y tipificarlos. La capacidad diferenciadora en el caso de las bacterias ácido lácticas (BAL) se basa en las características bioquímicas y los bioproductos del final de la fermentación de las especies a aislar (6, 7). Otra posibilidad es utilizar métodos que no dependan del cultivo, en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento. Se dispone actualmente de muchos medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de las bacterias lácticas aunque sólo a algunos de ellos se les considera selectivos, entre ellos está el M17 para *Lactococcus* spp, MRS para *Lactobacillus* spp y el MSE para *Leuconostoc* spp (8-11).

Los protocolos de aislamiento comienzan con diluciones seriadas en agua de peptona de la muestra y siembra en los medios selectivos para bacterias lácticas, mediante la técnica de siembra a profundidad con sobrecapa del agar selectivo utilizado, la incubación se realiza en condiciones de anaerobiosis. Para la confirmación de las colonias se realiza una tinción de gram y observación al microscopio (12-15).

Los métodos de identificación de microorganismos en sentido general se pueden hacer de diferentes formas. Específicamente en el caso de las BAL, muchos autores han empleado la técnica API 50 Biomeriux para la identificación bioquímica (15, 16); sin embargo, las técnicas moleculares ofrecen mayores ventajas pues se necesita de menor tiempo para obtener los resultados y es posible distinguir microorganismos a nivel de especie y serotipo.

El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) fue el primer método molecular que se empleó para la diferenciación de BAL. En esta técnica, se extrae el ADN (el genoma completo) de cada cepa, se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos se separan y visualizan por electroforesis en geles de agarosa (17). Se obtienen patrones de bandas con buena reproducibilidad pero por lo general son muy complejos. La manera en que más se ha empleado el RFLP es estudiando el polimorfismo de regiones particulares.

Para hacer una ribotipificación se transfieren fragmentos a una membrana, se hibridan con una sonda rARN marcada y se visualizan únicamente los fragmentos hibridados, que se pueden comparar con cepas de referencia.

Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se han empleado ampliamente para la determinación de microorganismos en alimentos por su simplicidad y rapidez (18). Entre ellas se encuentran el análisis de ADN amplificado al azar y el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Específicamente el PCR múltiple, que emplea diferentes pares cebadores que detectan simultáneamente las bacterias acidolácticas presentes, ha sido uno de los métodos empleados para determinar las BAL productoras de histamina, tiramina y putrescina (19, 20).

El análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), conocido también como APPCR (PCR cebado arbitrariamente) consiste en amplificar al azar regiones del ADN extraído de los microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de manera que se obtengan productos de PCR que permiten el alineamiento de los cebadores a pesar de que existan una o dos bases que no coincidan. Después de su separación mediante electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones simples de fragmentos de ADN de diferentes tamaños. El problema de esta técnica es su sensibilidad a las condiciones de reacción, por lo que es difícil, en ocasiones, obtener una reproducibilidad interlaboratorios adecuada. Esta técnica se ha empleado para la identificación de cepas de microorganismos probióticos de las subespecies *L. casei* subsp. *casei* y *L. casei* subsp. *rhamnosus* y de *L. acidophilus* (16).

El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) es una combinación de PCR y el empleo de enzimas de restricción. Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de ADN genómico (21). Ésta y otras técnicas basadas en el PCR han sido automatizadas mediante el uso de cebadores marcados con fluorescencia (22). Es la técnica que más se ha utilizado para el análisis de colecciones microbianas aisladas de alimentos fermentados.

Uno de ellos fue para determinar la dinámica de la población de la microbiota natural de un cultivo de suero utilizado para la producción del queso parmigiano reggiano, que reveló la presencia de cuatro biotipos entre los que se encontraban *Lactococcus helveticus* y *Lactococcus delbrueckii* ssp. *lactis* (23).

El análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) se basa en la obtención de rADNs mediante amplificación por PCR empleando cebadores universales, el producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa (24). Con esta metodología se obtienen patrones de bandas o «huellas digitales» de cada microorganismo. Se determinan, utilizando diferentes tipos de *software*, sus diferencias y se construyen dendrogramas. Para identificar los microorganismos clasificados es común incluir en el análisis cepas de referencia o identificar cepas representativas de cada grupo mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S (25). Generalmente se utilizan enfoques de taxonomía polifásica, incluyendo además de éstos, otros métodos de clasificación y de identificación.

La electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) emplea enzimas de restricción que digieren el ADN microbiano, el cual entonces está sujeto a separación electroforética. Las enzimas SfiI, NotI y SmaI se han empleado para diferenciar niveles intraespecíficos en diferentes especies de *Lactobacillus* aislados de vinos (26). Después de la separación, los fragmentos ADN se comparan en orden para evaluar la variabilidad durante la separación de las cepas de una misma especie (27-28). La mayor desventaja de esta técnica es su laboriosidad y el tiempo que se necesita para obtener los resultados así como que los equipos necesarios para su implementación son costosos.

Todas estas metodologías son muy convenientes para clasificar e identificar rápidamente colecciones de microorganismos; sin embargo, requieren del aislamiento y cultivo de los microorganismos, lo que encarece bastante el proceso al requerir de más tiempo.

Análisis de comunidades complejas mediante métodos que no requieren cultivo

Debido a que se recupera un porcentaje bajo de bacterias cultivables mediante las técnicas tradicionales de diferentes ambientes naturales, ha sido necesaria la búsqueda de metodologías que no dependan del cultivo de los microorganismos. Éstas han permitido explorar la diversidad microbiana, analizar la estructura de dichas comunidades y han revelado que la diversidad microbiana es mucho mayor de lo que se había considerado.

El primer paso es la extracción y purificación del ADN de las muestras. Ésta puede ser directa (extracción del ADN total de la muestra) o indirecta (extracción de microorganismos de la muestra, seguida de la extracción de ADN de estos). Posteriormente se amplifican, mediante PCR, ciertas regiones del gen ribosomal 16S. Dependiendo del grupo de microorganismos que se desee estudiar, se usan desde cebadores muy generales hasta muy específicos.

Para la separación de los fragmentos de rADN 16S amplificados, es necesario construir bibliotecas de clones de rADN 16S, cuya posterior secuencia y análisis permite determinar la diversidad microbiana. Es posible identificar o determinar cuáles son los microorganismos conocidos más cercanos a los miembros de la comunidad mediante la comparación de las secuencias de los fragmentos de rADN 16S con las bases de datos, como RDP (Ribosomal Database Project) o Genbank. Algunos investigadores emplearon esta estrategia para determinar la diversidad de bacterias Gram positivas del pozole (29). La mayoría de las secuencias se identificaron como bacterias lácticas, que ya se había reportado como el grupo predominante durante la fermentación de este alimento, pero además se detectaron especies que no habían sido aisladas mediante técnicas tradicionales de cultivo.

Perfil de "huellas digitales" microbianas

La obtención de "huellas digitales", que constituyen un patrón o un perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana, son las más utilizadas en la actualidad. En este caso se separan electroforéticamente los fragmentos de rADN amplificados (Fig. 1). La aplicación de electroforesis en geles con gradientes

desnaturalizantes, como el DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante) y TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura) permiten separar fragmentos de la misma longitud pero con diferentes secuencias, que son las características de los obtenidos mediante la amplificación de regiones de los genes ribosomales del ADN de una comunidad microbiana. Los agentes desnaturalizantes (una mezcla de urea y formamida en el caso del DGGE y la temperatura en el del TGGE) provocan la separación de las cadenas dobles de ADN. Éstas contienen dominios con temperaturas de fusión característicos, de manera que cuando se alcanza una determinada temperatura o concentración de desnaturalizante, la molécula se funde total o parcialmente y disminuye su velocidad de migración en el gel. Las temperaturas de fusión de esos dominios dependen de variaciones en sus secuencias de bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (30).

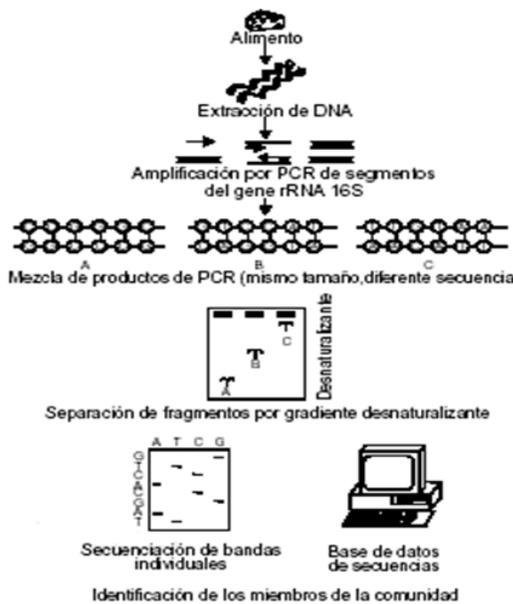


Fig. 1. Obtención de "huellas digitales" de comunidades microbianas en alimentos fermentados por el método DGGE (1).

Las investigaciones en este campo se han dirigido hacia la distribución espacial de la microbiota de matrices complejas, por ejemplo el pozole. En este caso se obtuvieron las "huellas digitales" por DGGE de fragmentos de ADN obtenidos al amplificar la región V3 de los genes de ARN 16S del ADN extraído de la masa. Demostraron que bacterias del género *Streptococcus*,

que no habían sido detectadas utilizando los métodos tradicionales de cultivo, predominan durante la fermentación (31). *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* constituyeron otro grupo predominante y también se encontraron lactococos y miembros del grupo *Leuconostoc-Weissella*. Demostraron la presencia de gradientes de poblaciones microbianas, siendo mayor la diversidad microbiana en la periferia que en el centro de la bola de masa. En otro estudio, utilizaron el mismo enfoque para estudiar la dinámica de la población microbiana durante la fermentación de este alimento, encontrando que la diversidad microbiana se mantiene durante la fermentación (32).

En el caso de la vainilla, los estudios se dirigieron a conocer la ecología microbiana durante el proceso tradicional del curado. En primer lugar se determinó la contribución de los microorganismos mediante el empleo de la técnica DGGE de rADN 16S/18S junto con métodos tradicionales de microbiología como parte de un enfoque polifásico para determinar la presencia y cambios de las comunidades microbianas durante el proceso del beneficio. Observaron que los mohos y levaduras desaparecían durante el escaldado de las vainas y detectaron números considerables de bacterias termofílicas y termotolerantes del género *Bacillus* durante el curado posterior, predominando *B. subtilis* y *B. licheniformis*. El análisis de DGGE reveló que no se pudieron detectar mediante los métodos tradicionales una gran parte de los microorganismos que se desarrollaron durante la etapa de aseado y sudado, por lo que sugirieron que el establecimiento de sus posiciones filogenéticas ayudaría a diseñar medios de aislamiento para estos microorganismos (33).

Otro producto en el que se ha utilizado es en el whisky de malta para conocer los cambios en su microbiota. Al emplear PCR-DGGE determinaron que al principio predominan *Streptococcus thermophilus* o *Saccharococcus thermophilus* y al final los lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus crispatus*) que no crecen en medios de cultivo convencionales (34).

La fermentación de salchichas es otro caso en el que participa una microbiota compleja y en los estudios realizados para describir la diversidad bacteriana durante la fermentación natural de salchichas italianas mediante PCR-DGGE se determinó la fuerte actividad de las bacterias lácticas durante la fermentación, con mayor diversidad durante las primeras horas y el predominio de *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus*, presentes tanto en los geles obtenidos a partir de ADN

como de ARN, a las que se atribuyeron los cambios físicos y sensoriales del sustrato. La principal diferencia entre los geles de ADN y de ARN fue la detección de *L. plantarum* únicamente en los primeros, cuyo producto de PCR se generó posiblemente a partir de células muertas. La técnica resultó muy conveniente, pues permite monitorear el estado de la fermentación y obtener resultados en un tiempo corto, lo cual hace posible la realización de ajustes tecnológicos inmediatos (35).

En el ragusano, queso artesanal de Sicilia, que posee características sensoriales únicas, resultado de las condiciones ambientales locales, al estudiar la evolución de los cambios microbianos durante su maduración utilizando técnicas microbiológicas clásicas y técnicas moleculares independientes del cultivo (PCR, RT-PCR y DGGE de genes de ARN 16S obtenidos al usar cebadores tanto de bacteria como específicos para el grupo *Lactobacillus*), observaron que en la leche utilizada como sustrato había presencia de *Leuconostoc* y *Lactococcus lactis*, no muy activas metabólicamente, cuyas bandas desaparecieron después de la cocción de la cuajada y de *Macrococcus caseolyticus* metabólicamente activo tanto en la leche como en la cuajada cocida. Durante la maduración observaron presencia de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* que fueron las más activas en esta etapa, por lo que consideraron que están relacionadas con el desarrollo del sabor y el aroma del producto y que deben estar bien adaptadas a las condiciones ambientales durante la maduración de este queso. *L. delbrueckii*, identificada como bacteria importante en los quesos estudiados, no fue aislada en medios selectivos. Esto demuestra la importancia de incluir métodos independientes del cultivo para estudiar microbiotas complejas, como la que participa en la fermentación de este queso (36).

Comparación de la identificación por técnicas moleculares respecto a las bioquímicas

No cabe duda que la taxonomía de las bacterias ácido lácticas ha evolucionado en los últimos 15 años. De agrupar a los integrantes por las características fenotípicas tales como fermentación de carbohidratos, tinción de gram y morfología, se ha pasado a agruparse de acuerdo a características genotípicas como la secuencia de la subunidad del 16S del ADN ribosomal (37). Esto trajo como consecuencia que algunas cepas que estaban agrupadas en una especie mediante el método fenotípico ahora estén formando parte de otras especies según los métodos genéticos.

En un estudio realizado para la identificación molecular de probióticos aislados de alimentos se observó que siete de las cepas analizadas (58,3 %) coincidieron en la identificación por métodos moleculares y bioquímicos; se encontró que dos cepas de *L. casei subsp. rhamnosus* (16,6 %) coincidieron con la misma especie al analizarse con la técnica de PCR y el método bioquímico; en cambio, de las seis cepas de *L. acidophilus* sólo cinco coincidieron (41,6 %) y una fue identificada como *L. casei subsp. casei* y de las cuatro cepas de *L. paracasei*, una fue *L. casei subsp. rhamnosus*, dos de *L. casei subsp. casei* y otra no pudo ser identificada (16).

En un estudio realizado, un tercio de los lactobacilos identificados difirieron al ser identificados por API y PCR. En el caso del grupo de lactobacilos homofermentativos obligados, la técnica molecular reasignó cinco de nueve cepas, cabe señalar que en dicho estudio, dos de cinco cepas (40 %) de *L. acidophilus* no pudieron ser confirmadas por el método molecular y una cepa de *L. rhamnosus* fue identificada como *L. paracasei* (38).

Otros estudios encontraron que más de la mitad de los lactobacilos analizados (*L. jensenii* y *L. gasseri*) habían sido identificados erróneamente como *L. acidophilus* utilizando el API 50 CH al identificar dichas cepas utilizando sondas de ADN. Se encontró que hay un alto nivel de variabilidad fenotípica entre especies probióticas de lactobacilos y que sugiere, en combinación con una limitada base de datos para la identificación de estas especies el uso limitado de este método y de otros fenotípicos de identificación (39).

Las diferencias en la identificación por los métodos moleculares y bioquímicos se encuentran con frecuencia y se sugiere que se deben a que la base de datos del método API no está actualizada con respecto a la taxonomía más reciente, lo que conducirá a una errónea identificación o a resultados confusos.

CONCLUSIONES

El mejor conocimiento sobre la vida microbiana en estos alimentos permitirá no sólo diseñar cultivos iniciadores adecuados, sino monitorear y controlar el desarrollo y la actividad de las poblaciones microbianas complejas que se requiere actúen en ciertos alimentos fermentados. Los avances recientes en los métodos para el análisis de comunidades microbianas hacen posible complementar a los métodos tradicionales para obtener información sobre aspectos importantes de la ecología microbiana de alimentos fermentados: diversidad, estructura y función.

REFERENCIAS

1. Díaz, G. y Wachter, C. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 45 (1-2): 30-40, 2003.
2. Nyström, T. *BioEssays* 25: 204-211, 2003.
3. Mataragas, M.; Drosinos, E.; Vaidanis, A. y Metaxopoulos, I. *J. Food Sci.* 71: 157-167, 2006.
4. Beldarraín, T.; Ramos, M.; Santos, R.; Bruselas, A.; Miranda, A. y Vergara, N. *Cienc. Tecnol. Alim.* 17 (2): 16-20, 2007.
5. Amann, R. y Kühn, M. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 352-358, 1998.
6. Suarez, J. *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyaca)*. (tesis entregada en opción al título de Zootecnista, Universidad de La Salle, Bogotá) 2008, 80 p.
7. Martín del Campo, M.; Cástulo, I.; Gómez, H.; Héctor, E. y Alaníz, R. *e-Gnosis*, Vol. 6: 1-17, 2008.
8. Gao, Y.; Jia, S.; Gao, Q. y Tan, Z. *Food Control* 21: 76-81, 2010.
9. Zamora, L. *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero*. (tesis entregada en opción al título de Doctor por la Universidad de Girona) 2003, 102 p.
10. Stanley, G. *Microbiología de los productos lácteos fermentados*. En: *Tecnología de los productos lácteos*, R. Early (Ed), Zaragoza, Ed. Acibia Zaragoza, España.
11. Hayaloglu, A.; Guven, M.; Fox, P. y Mcsweeney, P. J. *Dairy Sci.* 88: 3460-3474, 2005.
12. Olaoye, O. y Onilude, A. *Adv. in Nat. Appl. Sci.* 2: 253-257, 2008.
13. Olaoye, O. y Onilude, A. *Australian J. of Basic and Applied Sci.* 3(2): 460-466, 2009.
14. Beldarraín, T.; Cepero, T.; Bruselas, A.; Santos, R.; Ramos, M.; Moya, Y. y Núñez de Villavicencio, M. *Evaluación de las propiedades de cultivos lácticos para su empleo como bioprotectores en productos cárnicos*. En (CDROM) *Memorias del 12 Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos*, Puerto Vallarta, México, 2010, pp. 199-202.
15. Rodríguez, M.; Chacón, Z.; Guerrero, B.; Rojas, J. y López, G. *FCV-LUZ XVII* (6): 641-646, 2007.
16. Martínez-Barragán, I.; González-Martínez, B.; Campos-Góngora, E.; Barba de la Rosa, A. y Jiménez-Salas, Z. *Salud Pública y Nutrición* 9 (4): 1-9, 2008.
17. Beasley, S. *Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota*. Academic Dissertation in Microbiology. Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki Graduate School in Biosciences. University of Helsinki, 2004, 57 p.
18. Tamang, J.; Tamang, B.; Schillinger, U.; Franz, Ch.; Gores, M. y Holzapfel, W. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 347-356, 2005.
19. Marcobal, A.; de las Rivas, B.; Moreno-Arribas, M. y Muñoz, R. *J. Food Prot.*, 68: 874-878, 2005.
20. Constantini, A.; Cersosimo, M.; del Prete, V. y García-Moruno, E. *J. Food Prot.* 69: 391-396, 2006.
21. Boldo, X.; Villa-Tanaca, L.; Zúñiga, G. y Hernández-Rodríguez, C. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4799-4804, 2003.
22. Rodríguez, E.; Arqués, J.; Rodríguez, R.; Núñez, M. y Medina, M. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 259-263, 2003.
23. Cocconcelli, P.; Parisi, L. y Botazzi, V. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 8-12, 1997.
24. Liu, W.; T. Marsh, H. y Forney, L. J. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11): 4516-4522, 1997.
25. Rodríguez, H. y de las Rivas, R. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 70-78, 2007.
26. Rodas, A.; Ferrer, S. y Pardo, I. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 55: 197-207, 2005.
27. Pozo-Bayón, M.; Alegría, E.; Polo, M.; Tenorio, C.; Martín-Álvarez, P.; Calvo de la Banda, M.; Ruiz-Larrea, F. y Moreno-Arribas, M. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8729-8735, 2005.
28. Hernández, T.; Estrella, I.; Pérez-Gordo, M.; Alegría, E.; Tenorio, C.; Ruiz-Larrea, F. y Moreno-Arribas, M. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5260-5266, 2007.
29. Escalante, A.; Wachter, y Farrés, A. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 21-31, 2001.
30. Muyzer, G. y Smalla, K. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141, 1998.
31. Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C. y Guyot, J. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12): 5464-5473, 1999.
32. Ben Omar, N. y Ampe, F. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9): 3664-3673, 2000.
33. Röling, W.; Kerler, J.; Braster, M.; Apriyantono, A.; Stam, H. y H. W. van Verseveld. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5): 1995-2003, 2001.
34. van Beek, S. y Priest, F. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(1): 297-305, 2002.
35. Cocolin, L.; Bisson, L. y Mills, D. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 81-87, 2000.
36. Randazzo, C.; Torriani, S.; Akkermans, A.; de Vos, W. y Vaughan, E. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4): 1882-1892, 2002.
37. Ben Amor, K.; Vaughan, E. y de Vos, V. *J. Nutr. Suppl.*: 741S-747S, 2007.
38. Annuk, H.; Shchepetova, J.; Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Zilmer, M. y Mikelsaar, M. *J. Appl. Microbiol.* 94 (3): 403-412, 2003.
39. Boyd, M.; Antonio, M. y Hillier, S. *J. Clin. Microbiol.* 43 (10): 5309-5311, 2005.