

Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*)

Rocío Pérez-y-Terrón¹, Thania S. Gonzalez-Montfort¹, Jesús Muñoz-Rojas²

Laboratorio de Microbiología Molecular¹, Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas²

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Puebla, Pue., México

[rociperez33, xanath_i16, joymerre]@hotmail.com

Abstract— The microbial antagonism is deleterious or negative association; is the inhibition, damage or death of a microorganism by another action. The objective of the study was to determine the antagonistic effects of different isolates of indigenous microbiota grown in greenhouse tomato and corn of the State of Puebla, against the bacteria *Burkholderia cepacia* (H1A). Fifteen strains were used, thirteen came from red tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill) and two came from corn (*Zea mays*), none of them showed antagonism against *B. cepacia* for the tests about simultaneous inhibition, agar diffusion and detection with sensi-disc. Regarding the test of double layer, 26.6% of the strains (all of them isolated from red tomato), were able to inhibit *B. cepacia* growth; these strains belong to the genres coming from: *Pseudomonas* (2S3B, 2H4B), *Sphingomonas* (2S1A) and *Chromobacterium* (2S1C).

Keyword— Antagonism, *Burkholderia cepacia*, red tomato, corn.

Resumen— El antagonismo microbiano es una relación deletérea o negativa; es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antagónico de diferentes cepas aisladas de la microbiota autóctona de jitomate cultivado en invernadero y maíz del Estado de Puebla, contra *Burkholderia cepacia* (H1A). Se utilizaron 15 cepas de las cuales ninguna presentó antagonismo hacia *B. cepacia* para los ensayos de inhibición simultánea, difusión en agar y detección con sensi-disco. Para la prueba de doble capa el 26.6% de las cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. cepacia*, estas cepas pertenecen a los géneros de *Pseudomonas* (2S3B, 2H4B), *Sphingomonas* (2S1A) y *Chromobacterium* (2S1C).

Palabras claves— Antagonismo, *Burkholderia cepacia*, jitomate, maíz.

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen para que en la mayoría de los casos no desarrollen la enfermedad. En las plantas, los microorganismos están en un equilibrio dinámico en su superficie en condiciones naturales [1].

Cuando las poblaciones de organismos se encuentran reducidas debido a las acciones naturales de sus depredadores, parásitos, antagonistas y enfermedades, el proceso se conoce como “control natural”, pero cuando se utiliza para el control de plagas es llamado control biológico o biocontrol [2]. En patología vegetal el término es aplicado para el uso de antagonistas microbianos que suprimen enfermedades, así como el uso de huéspedes patógenos específicos para el control de malezas [3].

El antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra. Numerosos microorganismos saprófitos de la rizosfera y de la filosfera, así como la epiflora que existe en la superficie de la hoja, protegen a las plantas contra patógenos; en los últimos años se ha incrementado el interés en este fenómeno ya que se puede utilizar en su protección reduciendo infecciones. Por lo que se ha tratado de aprovechar las relaciones

antagonistas entre las poblaciones microbianas, para controlar patógenos vegetales debido al efecto antagonico [4, 5].

Las características óptimas que debe poseer un antagonista microbiano útil en cultivos vegetales son las siguientes: ser genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de producir en medios de bajo costo, resistente a los fungicidas, compatible con procedimientos de procesos comerciales, poder establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no ser patogénico en el hospedero y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana [6].

II. ANTECEDENTES

A. *Burkholderia cepacia*

Esta bacteria fue identificada en 1950 por Burkholder, como un agente fitopatógeno responsable de la podredumbre de los bulbos de cebolla. Fue originalmente asignado al género *Pseudomonas* como *P. cepacia* recibiendo a lo largo del tiempo otras denominaciones como *P. multivorans* y *P. kingii* [7].

B. cepacia es una bacteria muy atractiva por su gran diversidad genética, así como los roles que desempeña asociado con diferentes especies, presentándose como patógeno de plantas, saprofito, biorremediador, estimulador del crecimiento vegetal y agente de biocontrol en diferentes cultivos de interés agrícola. Entre sus mecanismos de acción se destacan el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de fitohormonas y el biocontrol de patógenos [8].

B. Antagonismo

La actividad inhibitoria de *B. cepacia* contra una variedad de microorganismos fitopatógenos ha sido atribuida a la producción de metabolitos secundarios como cepacina, pirrolnitrina, altericidina y otros compuestos volátiles y no volátiles aun no identificados [9]. Además se piensa que el 99% de las bacterias pueden al menos producir una bacteriocina, que son compuestos proteicos letales para una bacteria y son producidos por otras cepas, un ejemplo son las halocinas [10,11].

C. Patogenicidad

Desde comienzos de la década de 1980 *B. cepacia*, adicionalmente ha surgido como causa de infecciones humanas oportunistas sobre todo en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y fibrosis quística, además del “síndrome de cepacia”, que se manifiesta por insuficiencia respiratoria progresiva grave y bacteriemia [12], presentando aproximadamente un 20% una neumonía fulminante. En los pacientes neutropénicos puede producir bacteriemia de curso fatal por tratarse de un microorganismo oportunista de difícil manejo terapéutico debido a su multiresistencia [13].

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Las bacterias utilizadas provienen de muestreos en las principales zonas productoras de jitomate en el Estado de Puebla, México. Estas se aislaron a partir de hoja, fruto y suelo [14].

A. Pruebas antagonismo microbiano

Para cada una de las pruebas, se efectuaron 3 réplicas. Todos los ensayos en placa se realizaron con agar soya tripticaseína (TSA). La actividad inhibitoria se cuantificó observando la presencia de halos de inhibición (prueba positiva).

Inhibición simultánea: Se sembró de manera masiva *B. cepacia* (H1A), a un concentración de 7×10^8 ufc/ml. En seguida con ayuda de una micropipeta se colocaron de manera radial gotas con $3 \mu\text{l}$ de las cepas antagonicas. Se dejó incubar durante 24 horas a 29°C .

Difusión en agar: Se sembró *Burkholderia cepacia* en caldo LB a una dosis de 5×10^8 ufc/ml, después esta se agregó a un matraz que contenía medio TSA a punto de solidificar, se vació en placas Petri y se dejaron enfriar durante 10min. Posteriormente a cada una de las placas se le hicieron 5 pocillos de 6mm de diámetro por 1cm de alto, sin que estos tocan por completo el fondo de la placa, en los cuales se vertieron $40 \mu\text{l}$ de las bacterias antagonicas. Finalmente las placas se incubaron a 29°C por 24 horas.

Detección con sensi-disco: Se efectuó un sembrado masivo de *B. cepacia* a una dosis de 5×10^8 ufc/ml, a continuación se depositaron discos de papel filtro estériles de 5mm de diámetro, los cuales fueron previamente humedecidos con cada una de las cepas utilizadas como antagonistas; estos fueron colocados en la caja Petri de manera radial. Por último las placas fueron incubadas a 29°C por 24 horas.

Doble capa: En una caja Petri que contenía medio TSA se colocaron $50 \mu\text{l}$ de inóculo de cada una las cepas a retar, las cuales se encontraban en fase estacionaria y se incubaron a 29°C durante 24 horas; después se procedió a remover el crecimiento colonial, posteriormente la placa de expuso hacia abajo en una cama de cloroformo durante una hora, con la finalidad de remover al máximo las células bacterianas; una vez limpia, se le agregó una segunda capa de agar TSA más $100 \mu\text{l}$ de *B. cepacia* la cual se encontraba en fase estacionaria. Para finalizar se dejó incubar por 24 horas a 29°C .

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar el efecto antagonico entre dos especies microbianas, si bien las técnicas utilizadas en este trabajo son comúnmente ensayos inmunológicos, representan ser las adecuadas para poder evaluarlo, debido a que se logra visualizar en un medio sólido la actividad productora de metabolitos tóxicos de una cepa antagonica hacia la que es sensible [11].

Tabla 1. Relación de las cepas utilizadas y concentraciones inoculadas.

No.	Especie	Cepa	ufc/ml
1	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	F1B	1×10^9
2	<i>Pasteurella trehalosi</i>	F2A	1×10^8
3	<i>Burkholderia gladioli</i>	H2CB	$1-3 \times 10^8$
5	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	H2F	$4-6 \times 10^7$
6	<i>Pseudomonas luteola</i>	2S3B	$2-5 \times 10^7$ a 2×10^8
7	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2S1B	7×10^8 a 1×10^9
8	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	TS2A	$4-5 \times 10^7$
9	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1h4b	$1-9 \times 10^7$
10	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2S1A	-
11	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2H2B	$1-4 \times 10^9$
12	<i>Pseudomonas oryzae</i>	2H4B	9×10^7 a 1×10^8
13	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2S1C	-
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2S3BA	-
Cepas obtenidas de maíz			
15	<i>Pantoea ananatis</i>	2665	3×10^7 a $1-2 \times 10^8$
16	<i>Pantoea stewartii</i>	2715	$7 \times 10^7/10^8$ y 1×10^9

Las cepas 10, 13 y 14 no fueron ser contabilizadas debido a que las ufc crecen en forma agregada aún después de estar diluidas.

Para la prueba de inhibición simultánea se observó que el 100% de los casos ambas cepas crecieron, sugiriendo así un efecto sinérgico entre ellas: *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella trehalosi*, *Burkholderia gladioli*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Pseudomonas luteola*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Pseudomonas oryzae*, *Chromobacterium violaceum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea ananatis* y *Pantoea stewartii*.

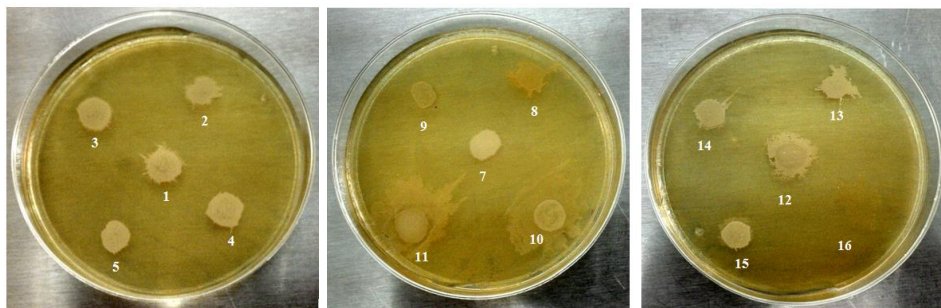


Fig. 1. Prueba de inhibición simultánea. Se aprecia el crecimiento de las cepas tanto antagonicas como de *B. cepacia*, 1, *Pasteurella pneumotropica*; 2, *Pasteurella trehalosi*; 3, *Burkholderia gladioli*; 5, *Psychrobacter phenylpyruvicus*; 6, *Pseudomonas luteola*; 7, *Chryseobacterium meningosepticum*; 8, *Chryseobacterium indologenes*; 9, *Aeromonas salmonicida*; 10, *Sphingomonas paucimobilis*; 11, *Brevundimonas vesicularis*; 12, *Pseudomonas oryzae*; 13, *Chromobacterium violaceum*; 14, *Stenotrophomonas maltophilia*; 15, *Pantoea ananatis*; 16, *Pantoea stewartii*. El número 4 pertenece a *B. cepacia* (H1A) la cual se sembró de manera masiva.

Para el ensayo de difusión en agar el 66.7% de las bacterias antagonicas creció, *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella trehalosi*, *Pseudomonas luteola*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas oryzae*, *Chromobacterium violaceum*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pantoea ananatis* lo que podría indicar la existencia de un efecto sinérgico de *B. cepacia* hacia estas bacterias.

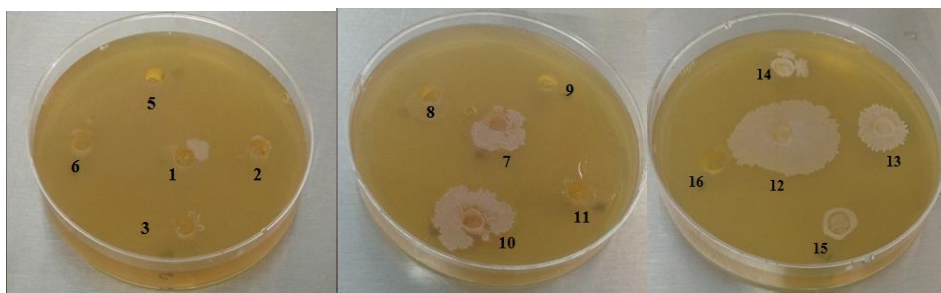


Fig. 2. Prueba de difusión en agar. 1, *Pasteurella pneumotropica*; 2, *Pasteurella trehalosi*; 3, *Burkholderia gladioli*; 5, *Psychrobacter phenylpyruvicus*; 6, *Pseudomonas luteola*; 7, *Chryseobacterium meningosepticum*; 8, *Chryseobacterium indologenes*; 9, *Aeromonas salmonicida*; 10, *Sphingomonas paucimobilis*; 11, *Brevundimonas vesicularis*; 12, *Pseudomonas oryzae*; 13, *Chromobacterium violaceum*; 14, *Stenotrophomonas maltophilia*; 15, *Pantoea ananatis*; 16, *Pantoea stewartii*. El número 4 pertenece a *B. cepacia* (H1A) la cual se sembró de manera masiva.

En la prueba de detección con sensi-disco se observó que el 93.3% de las bacterias fueron capaces de crecer en presencia de *B. cepacia*, lo que se podría deber a que esta bacteria es capaz de promover un efecto sinérgico o en su caso no ejercer efecto alguno hacia ellas. Las cepas que presentaron este comportamiento fueron: *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella trehalosi*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Pseudomonas luteola*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Pseudomonas oryzae*, *Chromobacterium violaceum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea ananatis* y *Pantoea stewartii*.

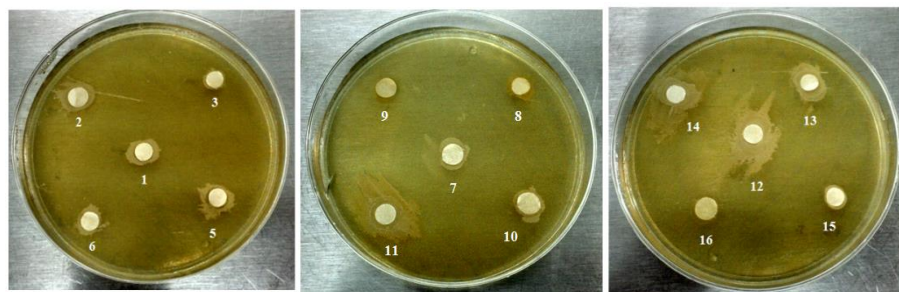


Fig. 3. Prueba de detección con sensi-disco. Se observa el crecimiento de las cepas antagonicas a excepción de la 3: *Burkholderia gladioli*. 1, *Pasteurella pneumotropica*; 2, *Pasteurella trehalosi*; 3, *Burkholderia gladioli*; 5, *Psychrobacter phenylpyruvicus*; 6, *Pseudomonas luteola*; 7, *Chryseobacterium meningosepticum*; 8, *Chryseobacterium indologenes*; 9, *Aeromonas salmonicida*; 10, *Sphingomonas paucimobilis*; 11, *Brevundimonas vesicularis*; 12, *Pseudomonas oryzihabitans*; 13, *Chromobacterium violaceum*; 14, *Stenotrophomonas maltophilia*; 15, *Pantoea ananatis*; 16, *Pantoea stewartii*. El número 4 pertenece a *B. cepacia* (H1A) la cual se sembró de manera masiva.

En las pruebas correspondientes a inhibición simultánea, detección con sensi-disco y difusión en agar no se presentó antagonismo de las cepas procedentes de jitomate y maíz contra *B. cepacia*, sino que ambas cepas crecieron, es decir, ninguna inhibió el desarrollo de la otra. Aunque *B. cepacia* puede producir metabolitos secundarios para la inhibición del desarrollo de otras cepas, el hecho de que no tenga efecto sobre las cepas antagonicas podría explicarse asociando lo reportado por Joerger, 2002, [10] quien puntualiza que pueden presentarse ciertos genes en algunas bacterias, que les confieren un incremento en la resistencia a péptidos antimicrobianos producidos por otras.

En adición, en estas pruebas se encontraron 5 casos especiales, en las cuales las bacterias antagonicas fueron capaces de crecer en inhibición simultánea y detección con sensi-disco: *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Brevundimonas vesicularis* y *Pantoea stewartii*, pero no en difusión en agar, esto podría deberse a que en esta técnica se necesita que las muestras utilizadas sean suficientemente solubles para que puedan difundir [15].

En la técnica de doble capa se presentaron 4 (26.6%) cepas capaces de inhibir el crecimiento de *B. cepacia*, esto puede deberse a que, como primero se hace crecer a la cepa productora de una sustancia inhibidora, permitiendo su liberación en el medio de cultivo, y después se siembra la cepa contra la cual se desea observar el efecto antagonico, la que resulta sensible a dicho efecto, se manifiesta presentando un halo de inhibición [11].

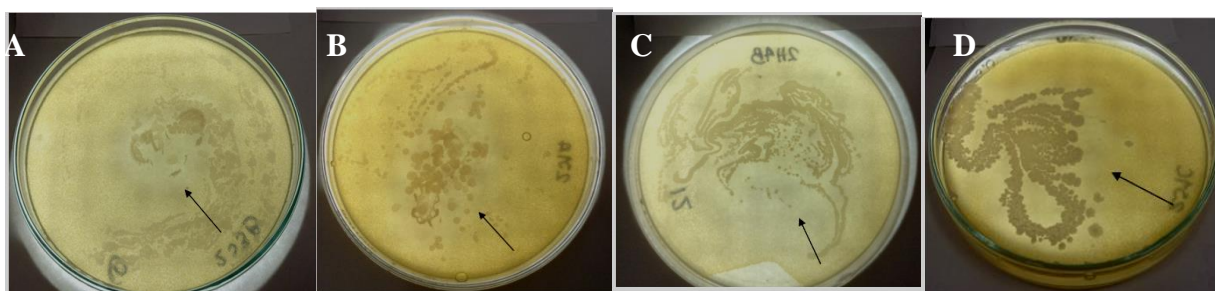


Fig. 4. Técnica doble capa. A) *Pseudomonas luteola* (2S3B), B) *Sphingomonas paucimobilis* (2S1A), C) *Pseudomonas oryzihabitans* (2H4B), D) *Chromobacterium violaceum* (2S1C), las flecha muestra las zonas de inhibición ejercidas por las bacterias antagonicas hacia *B. cepacia* (H1A).

Las bacterias pertenecientes a las especies de *Pseudomonas luteola* y *Pseudomonas oryzihabitans* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. cepacia*; el género *Pseudomonas* es capaz de producir metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de otras bacterias, así como de enzimas

extracelulares incluyendo lipasas y amilasas. Además, los miembros de este género se encuentran involucrados en la biodegradación tanto de compuestos naturales como de componentes químicos [16].

Como en el caso anterior otra cepa capaz de inhibir el crecimiento de *B. cepacia* fue *Sphingomonas paucimobilis*, ésta última puede sobrevivir en ambientes con bajos nutrientes; producir biofilms o adherirse a los preexistentes e integrarse y sobrevivir por días o semanas dependiendo de las condiciones ambientales. Además diferentes estudios han demostrado que esta especie es un buen agente biorremediador; ya que es capaz de metabolizar contaminantes orgánicos complejos, así como compuestos refractarios, aromáticos simples e hidrocarburos poli-aromáticos, así como la habilidad para descomponer y sintetizar macromoléculas [17, 18, 19, 20].

Por último, *Chromobacterium violaceum* logró inhibir el crecimiento de *B. cepacia*. *C. violaceum* es capaz de producir un compuesto pigmentado de color púrpura, con actividad bactericida y de amplio espectro, llamado violaceína [21]. Se sabe que las cepas pertenecientes a esta especie son capaces de producir cianuro de hidrógeno y exoproteasas, las cuales junto con la violaceína son reguladas mediante la producción endógena de AHL (*N*-acil homoserina lactona) [22].

También en la prueba de doble capa, se encontraron 6 casos especiales: *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas luteola*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas oryzihabitans* y *Chromobacterium violaceum*; que junto con *Burkholderia cepacia*, fueron capaces de crecer aún después de ser expuestas una hora a vapores de cloroformo. En estudios realizados por Suryanarayana *et al* en 2013 [23], se menciona que en algunas especies al entrar en contacto con el hospedero, este solvente no interfiere con la síntesis de AHL, por lo tanto se sigue dando la producción de factores de virulencia, síntesis de exopolisacáridos, formación de biofilms, producción de antibióticos, pigmentos y movilidad (“swarming”). Además se ha visto que cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* spp. son capaces de degradar 1.9nmol de cloroformo por minuto [24].

Para finalizar *Burkholderia gladioli* no fue capaz de crecer en las pruebas de difusión radial y sensi-disco contra *Burkholderia cepacia*.

V. CONCLUSIONES

De las 15 cepas utilizadas en las pruebas de inhibición simultánea, difusión en agar y detección con sensi-disco no existió inhibición de estas cepas hacia *B. cepacia*. Además de que existieron casos en donde tanto la bacteria a antagonizar como las antagonicas crecieron. Para la prueba de doble capa, 4 cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. cepacia* y estas pertenecen a las especies de *Pseudomonas luteola*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas oryzihabitans* y *Chromobacterium violaceum*.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de la Dirección General de Planeación Institucional y la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

REFERENCIAS

- [1] Fernandez Orietta y Vega Larrea. 2001. Microorganismos antagonistas para el control Fitosanitario, Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos, Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica, No. 62 p. 96-100.
- [2] Hajek E. Ann, Natural Enemies: An Introduction to Biological Control, Cambridge University Press; First Edition edition, 396 paginas, April 5, 2004.

- [3] Pal, K. K. and B. McSpaddenGardener, Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health, Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, 2006.
- [4] Atlas, R.M. y Bartha, R., Ecología microbiana y Microbiología ambiental Pearson Educación, S. A. Madrid, 4ta edición, 2002
- [5] Andrews John H, Berbee Flora. M. and Nordheim Erik V., Microbial Antagonism to the Inmperfect Stage of the Apple Scab Pathogen, *Venturia inaequalis*, *Phytopathology* 73:228-234, 1983.
- [6] Bautista Baños S., El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos, *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, Julio, vol.8, número 001, Hermosillo Sonora, México, 2006.
- [7] Araque Yasmina, Vitelli-Flores Juana, Ramírez Alvaro, Alonso Guillermina, Rodríguez Lemoine Vidal. 2008. Identificación bioquímica y PCR especie específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28:82-88.
- [8] Toledo Y., Hernández A., Alvarez M., Martín G.M., Marquez R. 2002. Determinación del efecto antagónico de un biopreparado a partir de una cepa de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium* sp. en el cultivo del gladiolo (*Gladiolus*sp), *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p. 11-15.
- [9] Parra González Evis, Centeno Briceño Sara, Araque Calderón Yasmina, Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays*L.) bajo diferentes condiciones de cultivo, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:103-109, 2009.
- [10] Joerger R.D. 2002. Alternative to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, Symposium: use of antimicrobials in production.
- [11] Monroy Dosta María del Carmen, Castro Barrera Talía, Fernández Perrino Francisco José y Mayorga Reyes Lino. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas, *ContactoS* 73, 63-72
- [12] Koneman W. Elmer y Allen Stephen, Koneman Diagnostico Microbiológico: Texto y atlas en color, 6ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, 2008.
- [13] Gil D. De M. Monica, Bacteremia de curso fatal por *Burkholderia cepacia*: Revisión de la literatura a propósito de un caso clínico. , *RevChilInfect* , 18 (1): 41-44, 2001 Koneman W. Elmer y Allen Stephen, Koneman Diagnostico Microbiológico: Texto y atlas en color, 6ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, 2008.
- [14] Herrera Huesca Jesus Rafael, Flora bacteriana asociada a cultivos de jitomate (*Lycopersicum esculentum*, Mill) en el Estado de Puebla (Tesis de licenciatura), BUAP, Escuela de Biología, 2013.
- [15] Luttmann Werner, Bratke Kai, Küpper Michael, Myrtek Daniel; tr. de la Fuente Moreno Juan Luis, *Inmunología : manual de tecnicas de investigación en el laboratorio*, Acribia, 2008.
- [16] Khannous Lamia, Jrad Mouna, Dammak Mouna, Miladi Ramzi, Chaaben Nour, Khemakhem Bassem, Gharsallah Néji and Fendri Imen, Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions, *Lipids in Health and Disease* 13:9, 2014.
- [17] Özdemir Mehmet, Pekcan Sevgi, Emin Demircili Mehmet, Tasbent Esenkaya Fatma, Fezzioglu Bahadı, Pirinc Serife, Baykan Mahmut, A rare cause of bacteremia in a pediatric patient with down syndrome: *Sphingomonas paucimobilis*, *International Journal of Medical Sciencies*, 8(7):537-539, 2011.
- [18] Toh Han-Siong, Tay Hung-Tze, Kuar Wei-Khie, Weng Tzu-Chieh, Tang Hung-Jen, Tan Che-Kim., Risk factors associated with *Sphingomonas paucimobilis* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 44, 289e295, 2011.
- [19] Ryan M.P. and Adley C.C., *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism, *Journal of Hospital Infection*, 2010
- [20] Gusman Vera, Medic Deana, Jelesic Zora and Mihajlovic-Ukropina Mira, *Sphingomonas paucimobilis* as a biofilm producer, *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 64(4), 1327-1331, 2012

- [21] August P.R., Grossman T.H., Minor C., Draper M.P., MacNeil I.A., Pemberton J.M., Call K.M, Holt D. and Osburne M.S., Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from *Chromobacterium violaceum*, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2(4): 513-519, 2000.
- [22] Chernin S. Leonid, Winson Michael K., Thompson Jacquelyn M., Haran Shoshan, Bycroft Barrie W.,Chet Ilan, Williams Paul and Stewart Gordon S. A. B., Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing, Journal of Bacteriology. 1998, 180(17):4435.
- [23] Suryanarayana Vasvi Halkare, Bhagwath Arun Ananthapadmanabha, Devasya Rekha PUNCHAPADY, Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L, Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(12): 954-959
- [24] McClay Kevin, Fox Brian G. and Steffan Robert J., Chloroform Mineralization by Toluene-Oxidizing Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, vol 62. No.8, Agosto 1996, p.2716-2722.