

**Actividad antibiótico y antifúngica de *B. cepacia*
provenientes de ambientes nosocomiales.
Servicio Autónomo Hospital universitario
“Antonio Patricio Alcalá”. Cumaná, Venezuela**

*Antibiotic and Antifungi activity of B. cepacia originating
of nosocomial environmental. Independent Service University
Hospital “Antonio Patricio Alcalá”. Cumaná, Venezuela*

**Araque C., Yasmina^{1, 2}; Albarado Y., Luzmila²;
Centeno B., Sara²; Rodríguez-Lemoine,
Vidal^{3,4}; Vitelli- Flores, Juana⁴**

¹Postgrado en Ciencias médicas Fundamentales
Universidad de los Andes. ²Departamento de Bioanálisis,
Universidad de Oriente- Núcleo de Sucre.

³Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela.

⁴Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos-CVCM.
E-mail: yamasi40@gmail.com

Resumen

Burkholderia cepacia, es un bacilo Gram negativo, no fermentador, reconocido como causal de infecciones oportunistas; además de producir compuestos con actividad antimicrobiana. En el presente estudio se evaluó el antagonismo de nueve (9) aislados nosocomiales de *B. cepacia* contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias de ambientes hospitalarios. La detección antibacteriana y antifúngica, se determinó según la técnica de la doble capa y de los cortes cilíndricos en agar, respectivamente. Cuatro aislados de *B. cepacia* (CVCM: 626,1328, 1331 y 1332) inhibieron los diferentes géneros bacterianos analizados. *B. cepacia* CVCM 1332, inhibió a cinco (5) de las seis (6) especies de bacterias indicadoras, con halos de inhibición entre 11 y 22 mm; a excepción de *P. fluorescens*. Tres (3) aislados de *B. cepacia* no presentaron actividad antibacteriana. Dos aislados de *B. cepacia* inhibieron los hongos estudiados (*Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium frequentans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium echinulatum*, *Candida tropicalis*, *Candida famata*). Las cepas CVCM 626, 1328 y 1331 presentaron tanto actividad antibacteriana como antifún-

gica. Se comprobó el antagonismo de aislados nosocomiales de *B. cepacia* contra bacterias y hongos de ambientes hospitalarios, representando un factor importante en la colonización de áreas críticas, facilitando la aparición de cuadros infecciosos en pacientes allí reclusos.

Palabras clave: *Burkholderia cepacia*, antibiótico, antifúngico.

Abstract

Burkholderia cepacia is a Gram-negative and non-fermenter bacilli, known as a causal agent of opportunistic infections, as well as producer of compounds with antimicrobial activities. In the present study, the antagonism of nine (9) nosocomial isolates of *B. cepacia* against filamentous fungi, yeast and bacteria from hospital environments was evaluated. The antibacterial and antifungal detection was determined according to the double layer technique and cylindrical sections in agar, respectively. Four *B. cepacia* isolates (CVCM: 626, 1328, 1331 and 1332) inhibited the different bacterial species analyzed. *B. cepacia* CVCM 1332 inhibited five (5) of the six (6) indicators of bacterial species, with inhibition halos between 11 and 22 mm, with the exception of *P. fluorescens*. Three (3) *B. cepacia* isolates did not show antibacterial activity. Two *B. cepacia* isolates inhibited the studied fungi (*Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium frequentans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium echinulatum*, *Candida tropicalis*, *Candida famata*). The species CVCM 626, 1328 and 1331 showed both antibacterial and antifungal activities. The antagonism of nosocomial *B. cepacia* isolates against bacteria and fungi from hospital environments was demonstrated, representing an important factor in the colonization of critical areas, facilitating the appearance of infectious symptoms in hospitalized patients.

Key words: *Burkholderia cepacia*, antibiotic, antifungi.

Introducción

Burkholderia cepacia incluye bacilos Gram negativos, no fermentadores (BGNNF), los cuales se encuentran en ambientes naturales y hospitalarios; taxonómicamente, se clasifican en un complejo que comprende nueve especies distintas, referidas como el complejo *Burkholderia cepacia* (1).

Esta bacteria ha sido reconocida como un patógeno humano emergente que causa numerosas infecciones oportunistas y nosocomiales, particularmente en pacientes con fibrosis quística (1, 2).

B. cepacia, fue originalmente descrito como agente causal de la podredumbre de los bulbos de cebolla (3), y fue inicialmente considerado por ser un patógeno de plantas, pero también *B. cepacia* en las comunidades

microbianas del suelo, expresa su extraordinaria versatilidad metabólica, degradando compuestos aromáticos clorados (tóxicos presentes en complejos herbicidas y pesticidas, algunos con potencia carcinogénica) para utilizarlo como fuente de carbono y energía (4, 5); así como también la producción de compuestos extracelulares que incluyen proteasas, hemolisinas, lecitinasas y lipopolisacáridos, además de compuestos con actividad antibiótica (6, 7). Entre los mecanismos antagonicos de *B. cepacia* se encuentran la producción de antibióticos (8), producción de sideróforos (9) y la competencia por nutrientes (10).

La capacidad antagonista de esta bacteria ha sido probada principalmente contra hongos fitopatógenos, levaduras y algunas especies bacterianas como *Bacillus subtilis*,

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (7) y también, puede antagonizar y represar muchos patógenos del suelo, y plantas tales como: *Alternaria*, *Aphanomyces* y *Rhizoctonia solani*, los cuales atacan plantas de interés agrícola como oleaginosas, guisantes y hortalizas (11, 12)

Cain *et al.* (13) caracterizaron aislados de *B. cepacia* con un amplio rango de actividad antimicrobiana contra hongos, levaduras y bacterias, atribuyendo esta capacidad a la excreción de compuestos extracelulares por esta bacteria.

En los últimos años miembros del Complejo *B. cepacia* han emergido como agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos (14) y biorremediación (15-17); sin embargo son patógenos importantes en pacientes con fibrosis quística (18, 19) y provocan infecciones nosocomiales en individuos inmunocomprometidos (20, 21).

Debido a las evidentes contradicciones, y como resultado de la relevancia clínica de los miembros del Complejo *B. cepacia* y sus relaciones interespecies, se ha cuestionado severamente su uso como un agente de bioremediación o biocontrol (2), y actualmente se ha restringido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (22).

El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad antagonica de diferentes cepas nosocomiales de *B. cepacia* provenientes de muestras clínicas, contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias de ambientes hospitalarios.

Materiales y Métodos

Aislados de *Burkholderia cepacia*

Se analizó la capacidad antagonica a nueve (09) cepas de *B. cepacia* aisladas de diferentes muestras clínicas, obtenidas de pacientes recluidos en el Servicio Autónomo

Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá (SAHUAPA) Cumaná estado Sucre, Venezuela, las cuales fueron caracterizadas en el laboratorio de Biología de plásmidos-UCV y en el Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM), por métodos microbiológicos convencionales y mediante el sistema automatizado ATB-plus (23). Se empleó como control la cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (CVCM 626). A los aislados ensayados se les determinaron los patrones de susceptibilidad para un grupo de antimicrobianos (Tabla 1), mediante el método de difusión del disco en agar, en medio Muller-Hinton (Difco Laboratories), de acuerdo al criterio del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para bacilos Gram negativos no *Enterobacteriaceae* (24). Se empleó como cepa control, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los antimicrobianos probados fueron imipenem (IPM), tobramicina (TOB), amikacina (AK), aztreonam (ATM), ciprofloxacina (CIP), ceftazidima (CAZ), piperacilina (PIP), piperacilina-tazobactam (TZP) y trimetoprim-sulfamethoxazol (SXT (Araque y col., en proceso de publicación).

Aislados bacterianos indicadores de actividad antagonica

La actividad antagonica se evidenció empleando las siguientes cepas indicadoras: *Escherichia coli* K12 CVCM 178; *Staphylococcus aureus* CVCM 636 y CVCM 925; *Bacillus subtilis* CVCM 591; *Pseudomonas aeruginosa* CVCM 787; BGNNF CVCM 1411 y *Pseudomonas fluorescens* CVCM 1412, procedentes en su totalidad del CVCM.

Aislados fúngicos

Para probar la actividad antifúngica de *B. cepacia* se utilizaron las siguientes cepas de hongos filamentosos: *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium frequen-*

Tabla 1. Patrones Fenotípicos de resistencia a antimicrobianos de aislados de *Burkholderia cepacia* del SAHUAPA, Cumaná, estado Sucre. Venezuela.

CVCM	Muestra	Antimicrobianos									Fenotipo
		AK	TOB	IPM	ATM	PIP	CIP	SXT	CAZ	TZP	
1328	Liq.peritoneal	AK	TOB	IPM	ATM						A
1329	LCR	AK	TOB	IPM	ATM						A
1330	Catéter	AK	TOB	IPM	ATM						A
1332	Catéter arterial	AK	TOB	IPM	ATM						A
1356	Hemocultivo	AK	TOB	IPM	ATM						A
1357	Liq.peritoneal	AK	TOB	IPM	ATM						A
1331	LCR	AK	TOB		ATM						B
1282	Espuito	AK	TOB						CAZ		c

*Designación equivalente ATCC 25416. AK: amikacina, TOB: tobramicina, IPM: imipenem, ATM: aztreonam. PIP: piperacilina, CIP: ciprofloxacina, SXT: Trimetoprim Sulfametoxazol, CAZ: ceftazidima, TZP: piperacilina tazobactam LCR: Líquido cefalo raquídeo.

Fuente: (Araque et al. en proceso de publicación).

tans, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium echinulatum* y las levaduras *Candida tropicalis* y *Candida fomata*. Estas cepas pertenecen al cepario del laboratorio de Micología del Departamento de Bioanálisis UDO-Sucre, y fueron aisladas a partir de muestras obtenidas de diferentes ambientes del SAHUAPA.

Detección de actividad antagónica

La detección de sustancias tipo antibiótico se realizó según la técnica de la doble capa, desarrollada por Fredericg (25) realizándose por triplicado. Las cepas *B. cepacia* se sembraron en agar Luria Bertani (LB) a 35°C por 24 horas, y luego se preparó una suspensión en 2 ml de caldo LB, equivalente a 60 UK (Unidades Klett). Una vez crecidos los respectivos caldos fueron sembrados en agar LB, por punción en 4 puntos equidistantes de la placa. Posteriormente a la incubación a 35°C durante toda la noche, las colonias desarrolladas en las placas se expusieron a vapores de cloroformo (CHCl₃) durante 10 minutos y luego, a las placas se les añadieron 3

ml de agar fundido, previamente inoculado con 0,1 ml de un cultivo fresco de las cepas utilizadas como indicadores de antagonismo. Las placas se reincubaron a 35°C por 24 horas, luego de los cuales se procedió a observar la presencia o no de los halos de inhibición alrededor de la cepa antagónica.

Detección de actividad antifúngica

Estos ensayos se realizaron también por triplicado, aplicando el método de los cortes cilíndricos en agar (26). La cepas de *B. cepacia* fueron cultivadas en agar LB, en atmósfera de aerobiosis. Por otra parte, los hongos a ensayar fueron cultivados previamente en agar papa dextrosa (PDA), luego, se preparó una suspensión de los hongos cultivados en solución salina fisiológica estéril, equivalente a 10⁶ células/ml; posteriormente, 100 µl de la suspensión fueron resembrados en PDA. Una vez sembrados los hongos, se perforaron pozos de 5 mm de diámetro en el agar, en los cuales se colocaron discos de agar del cultivo bacteriano del tamaño equivalente al pozo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente de 3 a 5 días, realizando

la medición de los halos de inhibición en las placas de crecimiento.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados, mediante la medición de los halos de inhibición (en milímetros) de las bacterias y hongos empleados como indicadores, alrededor del inóculo de las cepas de *B. cepacia* ensayadas, promediando los valores obtenidos y representados en tablas.

Resultados

Actividad antagónica

Los resultados del ensayo para medir el efecto antibacteriano (Tabla 2), indicaron que de las nueve (09) cepas estudiadas, cuatro (04) produjeron efecto antagónico contra los diferentes géneros bacterianos analizados (cepas indicadoras). Se observó un efecto inhibitorio en la cepa *E. coli* CVCM 35 productora de colicina contra el aislado *E. coli* CVCM 178 indicadora, representando éste el control del experimento. *B. cepacia* CVCM 626 (ATCC 25416) produjo el mayor efecto inhibitorio contra *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*; asimismo, tres (03) de los aislados de *B. cepacia* produjeron efecto inhibitorio contra los aislados de *B. subtilis* CVCM 591 y *S. aureus* CVCM 925. *B. cepacia* CVCM 1332 presentó mayor actividad antagónica al inhibir a cinco (05) de las seis (06) especies bacterianas indicadoras, observándose halos de inhibición entre 11 y 22 mm, siendo *P. fluorescens* la única especie no inhibida. En cinco (05) aislados de *B. cepacia* (CVCM: 1329, 1330, 1356, 1357, 1282) no se observó efecto antagónico contra las diferentes especies bacterianas ensayadas. En la Figura 1, se observa el efecto antibacteriano de aislados de *B. cepacia*

CVCM 626 y CVCM 1328 frente **A:** *S. aureus* (CVCM 925) y **B:** *B. cepacia* CVCM 626 frente a **B:** *E. coli* (CVCM 178).

Actividad antifúngica

El efecto antifúngico de *B. cepacia* se evidenció en cinco (05) de los nueve (09) aislados (Tabla 3). Los aislados *B. cepacia* CVCM 626 y CVCM 1328, mostraron un comportamiento antagónico similar, produciendo inhibición contra las ocho (08) especies fúngicas. El mayor efecto inhibitorio se evidenció en *B. cepacia* CVCM 1328 contra *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium citrinum* con 26 y 24 mm de inhibición, respectivamente; mientras que los aislados *B. cepacia* CVCM 1357 y *B. cepacia* CVCM 1331 inhibieron menor cantidad de especies fúngicas. El menor efecto antagónico de los aislados de *B. cepacia*, se observó contra *Aspergillus niger*, ya que sólo presentó inhibición en presencia de *B. cepacia* CVCM 626 y CVCM 1328, con halos de inhibición de 8 y 13 mm, respectivamente. En la Figura 2 se observa el efecto antagónico de aislados de *B. cepacia* **A:** CVCM 626 y 1328 frente *A. Níger* y **B:** CVCM 626, 1328, 1331 y 1357 frente a *C. tropicales*.

Comparación de la actividad antibacteriana y antifúngica de *B. cepacia*

En la Tabla 4, se observa que tres de los aislados de *B. cepacia* (CVCM 626, 1328, 1331) presentaron tanto actividad antibacteriana como antifúngica; también muestra que el aislado *B. cepacia* CVCM 1332, produjo solamente efecto antibacteriano mientras que *B. cepacia* CVCM 1357 y 1329 presentaron únicamente efecto antifúngico. Tres (03) aislados (CVCM: 1330, 1356, 1282) no presentaron ningún tipo de actividad antibiótica.

Tabla 2. Efecto antibacteriano de aislados de *Burkholderia cepacia* productoras de sustancias tipo antibiótico.

Cepas bacterianas indicadoras	Halos de inhibición (mm) en cepas de <i>B. cepacia</i>									
	Control*	CVCM 626	CVCM 1328	CVCM 1329	CVCM 1330	CVCM 1331	CVCM 1332	CVCM 1356	CVCM 1357	CVCM 1282
<i>E. coli</i> CVCM 178	22	13	0	0	0	0	12	0	0	0
<i>S. aureus</i> CVCM 636	0	15	0	0	0	0	13	0	0	0
<i>B. subtilis</i> CVCM 591	0	21	0	0	0	11	15	0	0	0
BGNNF CVCM 1411	0	0	8	0	0	0	15	0	0	0
<i>P. fluorescens</i> CVCM 1412	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> CVCM 787	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0
<i>S. aureus</i> CVCM 925	0	17	0	0	0	15	11	0	0	0

**E. coli* CVCM 35 productora de colicina.

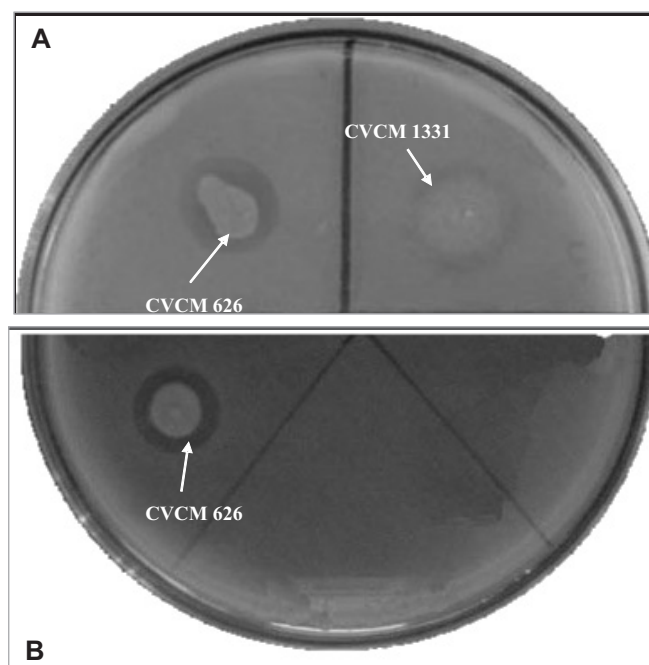
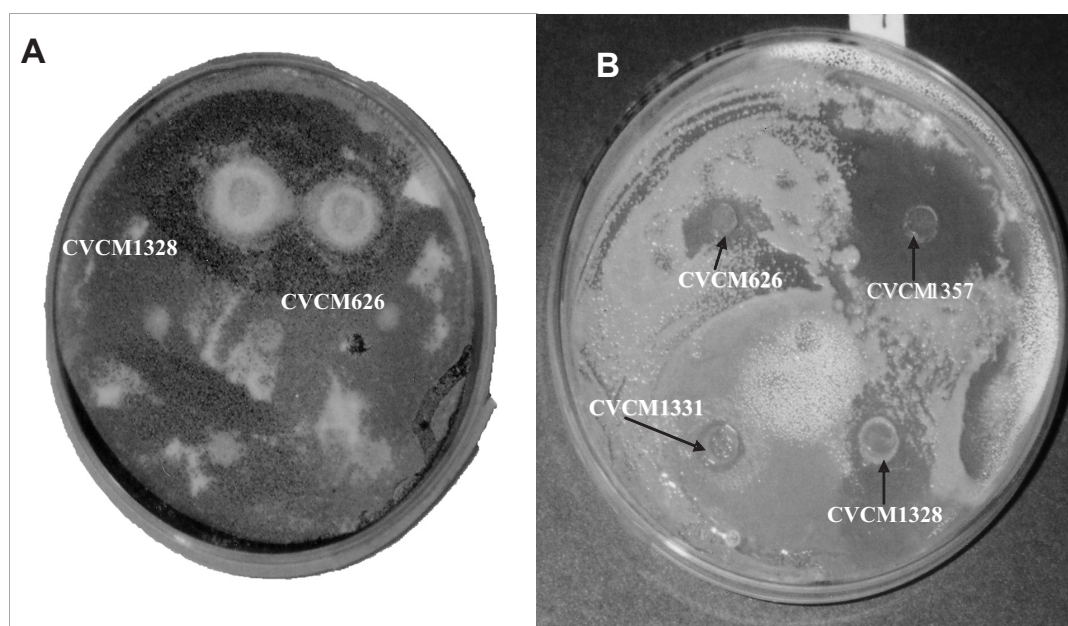
**Figura 1.** Antagonismo de aislados de *B. cepacia* frente a A: *S. aureus* (CVCM 925) y B: *E. coli* (CVCM 178).

Tabla 3. Efecto antifúngico de aislados de *Burkholderia cepacia* productoras de sustancias tipo antibiótico.

HONGOS	Halos de inhibición (mm) en cepas de <i>B. cepacia</i>								
	CVCM 626	CVCM 1328	CVCM 1329	CVCM 1330	CVCM 1331	CVCM 1332	CVCM 1356	CVCM 1357	CVCM 1282
<i>Fusarium solani</i>	15	18	5	0	0	0	0	5	0
<i>Penicillium citrinum</i>	17	24	0	0	10	0	0	8	0
<i>Penicillium frequentans</i>	15	17	0	0	10	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	8	13	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	20	26	19	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	10	12	0	0	8	0	0	15	0
<i>Candida famata</i>	10	7	5	0	0	0	0	13	0
<i>Penicillium echinulatum</i>	7	5	5	0	0	0	0	0	0

**Figura 2.** Antagonismo de aislados de *B. cepacia* frente a A: *A. niger* y B: *C. tropicalis*.

Discusión

La detección de especies bacterianas productoras de sustancias antagonicas representa el inicio de estudios sobre frecuencia y distribución de estos compuestos, siendo la etapa previa a su purificación y caracterización bioquímica; en el caso particular de

aislados nosocomiales de *B. cepacia*, es importante el conocimiento de los mecanismos antagonicos desarrollados por la bacterias como una estrategia para competir en ambientes hostiles y dominar el hábitat.

El efecto antibacteriano y antifúngico de *B. cepacia*, fue comprobado en la cepa *B. cepacia* CVCM 626 (ATCC 25416), y en 02 ais-

Tabla 4. Comparación del efecto antibacteriano y antifúngico producido por aislados nosocomiales de *B. cepacia*.

<i>B. cepacia</i>	Efecto antagónico	
	Nº Bacterias inhibidas	Nº Hongos inhibidos
CVCM 626*	5	8
CVCM 1328	1	8
CVCM 1329	0	4
CVCM 1330	0	0
CVCM 1331	2	2
CVCM 1332	6	0
CVCM 1356	0	0
CVCM 1357	0	4
CVCM 1282	0	0

*Designación equivalente ATCC 25416.

lados procedentes de muestras nosocomiales; observándose el mayor efecto contra hongos aislados a partir de muestras recolectadas del ambiente hospitalario. Asimismo, del total de cepas bacterianas ensayadas, en el presente estudio se observó que sólo un (01) aislado presentó actividad antibacteriana a diversos géneros, específicamente, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, BGNNF y *P. aeruginosa*. Estos resultados destacan el papel que desempeña *B. cepacia* como bacteria predatora, capaz de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos (13), aunado a la resistencia intrínseca de la bacteria para aminoglicósidos presente en los aislados ensayados, así como también a antibióticos betalactámicos como carbapenémicos y monobactámicos (Araque y col., en proceso de publicación). Sin embargo, los aislados ensayados presentaron un patrón de susceptibilidad uniforme a piperacilina, ciprofloxacina, Trimetoprim Sulfametoxazol, ceftazidima y piperacilina tazobactam, por lo que no se puede establecer una relación de la resistencia con los aislados que presentaron actividad antagónica.

Es importante destacar que el efecto antagónico se observó tanto en el aislado ambiental *B. cepacia* CVCM 626 como en dos (2) aislados nosocomiales, esto puede considerarse como una condición particular de algunos miembros del Complejo *B. cepacia* (*B. vietnamensis*, *B. ambifaria*, *B. cenocepacia*) las cuales se han reportado con actividad antibiótica y/o de biocontrol (22). Sin embargo, el antagonismo presente en aislados hospitalarios pudiera contribuir con la virulencia bacteriana, a través de la colonización de ambientes hospitalarios, facilitando de este modo su diseminación y la transferencia de elementos genéticos mediadores de resistencia como plásmidos, entre el mismo género y otros relacionados, incrementándose así la producción de cuadros infecciosos en pacientes inmunosuprimidos.

El efecto antibacteriano y antifúngico de *B. cepacia* proveniente de fuentes ambientales, se ha demostrado en diversos estudios (27-30), donde se han evaluado diferentes mecanismos antagónicos, tales como producción de enzimas extracelulares, antibióticos y competencia por nutrientes, siendo de

interés la producción de compuestos volátiles capaces de inhibir el crecimiento de hongos patógenos a las plantas como, *C. neoformans*, *Trichoderma viride*, *Sacharomices cerevisiae*, así como también frente a géneros bacterianos. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*. Sin embargo, son escasos los reportes sobre actividad antibiótico y antifúngica en aislados nosocomiales de *B. cepacia*. En el presente estudio, se pudo evidenciar el amplio espectro antagonico contra hongos de ambientes hospitalarios, estos resultados coinciden con estudios anteriores donde se evidencia además la secreción de sustancias que pueden degradar las paredes de las células fúngicas mediante la producción de enzimas extracelulares como proteasas, lecitinasas, elastasas, entre otras (31). Así también, la producción de compuestos antifúngicos y con actividad hemolítica por *B. cepacia* como pyrrolnitrin y cepalyginas (27, 28) pueden contribuir a la patogenicidad de la bacteria, proporcionando a la misma la capacidad de competir en diversos ambientes naturales y hospitalarios.

En los últimos años se han publicado estudios relativos a evaluaciones ecológicas, clínicas y de aspectos biotecnológicos de especies individuales dentro del complejo *B. cepacia*, así como de especies diversas (32-35), con el propósito de dilucidar las incógnitas sobre los diferentes miembros del Complejo *Burkholderia cepacia* y determinar el potencial patogénico de las cepas ambientales en la fibrosis quística e infecciones nosocomiales, así como su perspectiva en el campo biotecnológico; al respecto se han descrito especies con amplio espectro de actividad antimicrobiana, *B. ambifaria* 2.2 N y *B. cepacia* 670-2, las cuales tienen la habilidad de inhibir el crecimiento de una gran variedad de microorganismos (36).

En conclusión, se comprobó la actividad antagonica particular de algunos de aislados nosocomiales de *B. cepacia* contra bacterias y hongos de ambientes hospitalarios, atribuido a la producción de sustancias extracelulares o sustancias tipo antibiótico. Además, se evidenció la capacidad competitiva de esta bacteria en el ambiente hospitalario, al inhibir una variedad de géneros bacterianos, representando éste un factor importante en la colonización de áreas críticas hospitalarias, lo que pudiera facilitar la aparición de cuadros infecciosos en pacientes allí recluidos. Sin embargo, es necesario considerar un estudio más amplio con un mayor número de aislados y provenientes de diversas fuentes.

Agradecimiento

Se agradece al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, al Fonacit por el financiamiento a través del proyecto Lab 97000677, a la Comisión de Investigación, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, a través del proyecto CI-5-1005-1157 y al personal del Laboratorio de bacteriología del Servicio Autónomo Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá".

Referencias Bibliográficas

- (1) Bevivino A, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Chiarini L, Belli L, Piana S, Materazzo A, Vandamme P, Manno G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: Genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (3): 846-851.
- (2) Govan J, Hughes J, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. J. Med. Microbiol. 1996; 45: 395-407.
- (3) Burkholder, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopath. 1950;64: 468-475.

- (4) Dalmastrì C, Fiore A, Alisi C, Bevivino A, Tabacchioni S, Giuliano G. A rhizospheric *Burkholderia cepacia* complex population. Genotypic and phenotypic diversity of *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia ambifaria*. FEMS Microbiol Ecol. 2003; 46: 179-187.
- (5) Holmes A, Govan J, Goldstein R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* : A Threat to Human Health ?. Emerg.Infect.Dis. 1998;4:221-227.
- (6) Upadhyay R, Visintin L, Jayaswal R. Environmental factors affecting the antagonism of *Pseudomonas cepacia* against *Trichoderma viride*. Can. J. Microbiol. 1991; 37: 880-884.
- (7) Abe M, Nakazawa T. Characterization of hemolytic and antifungal substance, cepalyacin, from *Pseudomonas cepacia*. Microbiol. Immunol. 1994; 38(1): 1-9.
- (8) Arima K, Imanaka H, Kousaka H, Fukuda A, Tamura G. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. Agr. Biol. Chem. 1964; 28: 575-576.
- (9) Anderson R, Liberta A. Occurrence of fungal- inhibiting *Pseudomonas* on caryopses of *Tripsacum dactyloides* L. and its implication for seed survival and agricultural application. J. Appl. Bacteriol. 1986; 61: 195-199.
- (10) Borjesson T, Stollman U, Adamek P, Kaspersson A. Analysis of volatile compound for detection of molds in stored cereals. Cereal Chem. 1989; 66: 300-304.
- (11) Cartwright D, Chilton C, Benson D. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. Appl Microbiol Biotechnol. 1995; 43: 211-216.
- (12) King E., Parke, J.. Population density of the biocontrol agent *Burkholderia cepacia* AMMDRI on four pea cultivars. Soil Biol Biochem. 1996; 28: 306-312.
- (13) Cain C, Henry A, Waldo R, Casida L, Falkinham J. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66(9): 4139-4141.
- (14) Salles J., Souza F., Elsas Van J. Molecular method to assess the diversity of *burkholderia* species in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68:1595-1603.
- (15) Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Cantale C., Chiarini, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: Effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. FEMS. Microbiol. 1998; 27. 225-237.
- (16) Hebbart K, Martel M, Heuli, T. Suppression of pre and post emergence damping off in corn by *Burkholderia cepacia* . Eur J Plant Pathol 1998; 104. 29-36.
- (17) Pirone L. Detection of cultured and uncultured *Burkholderia cepacia* complex bacteria naturally occurring in the maize rhizosphere. Environ Microbiol. 2005; 7: 1734-1742.
- (18) Govan J, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis; mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev. 1996; 60 (3):539-574.
- (19) Mahenthiralingham E, Urban T, Goldberg J..The multifactorial, multiple plasmid *Burkholderia cepacia* complex. Nat Rev Microbiol. 2005; 3: 144 -156.
- (20) Butler S, Doherty C, Hughes J, Nelson J, Govan J. *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard?. J Clin Microbiol. 1995; 33:1001-1004.
- (21) Wigley P, Burton N. Genotypic and phenotypic relationships in *Burkholderia cepacia* isolated from cystic fibrosis patients and the environment. J Appl Microbiol. 1999;86: 460-468.
- (22) Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Visca P. *Burkholderia cepacia* complex species. Health hazards and biotechnological potential.. TRENDS . Microbiol. 2006; 14 (6): 277-286.
- (23) Araque Y, Vitelli-Flores J, Rodríguez-Lemoine V. Identificación de aislados de *Burkholderia* spp. y *Stenotrophomonas maltophilia* por métodos convencionales y el sistema ATB plus. Libro de resúmenes XXVII Jornadas Venezolanas de Microbiología Dr. "José Vicente Scorza". 2001. Pág. 216.
- (24) Clinical and Laboratory Standards Institute/ CLSI: Performance standards for anti-

- microbial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document, M100-S16: 2006.
- (25) Frederic P. Colicims. *Ann Rev Microbiol* 1957; 11: 7-22.
- (26) Farias M. Bacteriocins production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of food borne pathogens. *J. Food Protec.* 1994; 57(11):1013-1015.
- (27) El-Banna N, Winkelmann. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J. Appl. Microbiol.* 1998; 85: 69-78.
- (28) Abe M, Nakazawa T. Characterization of hemolytic and antifungal substance, cepalycin, from *Pseudomonas cepacia*. *Microbiol. Immunol.* 1994; 38(1): 1-9.
- (29) Mao W, Lewis J, Hebbar P, Lumsden R. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Disease.* 1997; 81(5): 450-454.
- (30) Upadhyay R, Visintin L, Jayaswal K. Environmental factors affecting the antagonism of *Pseudomonas cepacia* against *Trichoderma viride*. *Can. J. Microbiol.* 1991; 37: 880-884.
- (31) Fridlender M, Invar J, Chet I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 1993; 25: 1211-1221.
- (32) Coenye T, Vandamme P., Govan J, Lipuma J. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (10): 3427-3436.
- (33) Parke, J., Guriam-Sherman, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Ann Rev Phytopathol.* 2001; 39:225-258.
- (34) Ramette A, Lipuma J, Tiedje J. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 1(3): 1193-1201.
- (35) Balwin A, Mahenthiralingam A, Drevinek P, Vandamme P, Govan J, Waine D, *et al.* Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis.* 2007.13(3):458-461.
- (36) Cain C, Lee D, Waldo R, Henry A, Casida E, Wani M, *et al.* Synergistic antimicrobial activity of metabolites produced by a Nonobligate bacterial predator. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2003; 47(7): 2213-2117.