

## Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* CP1 aislada de bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.).

Characterization of *Klebsiella pneumoniae* CP1 isolated of onion bulbs (*Allium cepa* L.).

M. Rodríguez<sup>1</sup>, E. Lucci<sup>2</sup>, J. Faks<sup>3</sup>, M.A. Santana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto de Biología Celular, <sup>2</sup>Dpto. de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Apartado 89000, Caracas 1080-A, Venezuela. División de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar. <sup>3</sup>Instituto de Estudios Avanzados, Centro de Proteómica y Genómica, Caracas 1080-A, Venezuela.

### Resumen

Las bacteriosis de cebolla (*Allium cepa* L.) que producen podredumbre en el bulbo son causadas por varias especies de los géneros *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter* y *Burkholderia*. El objetivo de este trabajo fue identificar el microorganismo causante de la podredumbre blanda observada en bulbos de cebollas obtenidas de supermercados locales. La caracterización bioquímica fue realizada mediante la galería API 20E y la identificación molecular secuenciando el gen ARN-ribosomal 16S, amplificado por PCR. Adicionalmente se determinó la susceptibilidad a diferentes antibióticos y la capacidad de formación de biopelícula. Los resultados de la caracterización bioquímica y molecular del aislado CP1, que reprodujo los síntomas de patogenicidad en cebolla, confirmó una identidad con *Klebsiella pneumoniae* en un 97,9% y 99% respectivamente. CP1 mostró resistencia a antibióticos ampicilina, gentamicina, tobramicina, estreptomycin, kanamicina, trimetoprim y tetraciclina, así como la producción de una biopelícula fuertemente adherente. Estos resultados podrían sugerir un origen no ambiental de dicho aislado. *Klebsiella pneumoniae* es un importante patógeno de humanos y animales con una amplia distribución en el ambiente y en plantas, donde se la ha aislado como endófita por su capacidad de fijar nitrógeno. Este sería el primer reporte de *Klebsiella pneumoniae* como patógeno en cebolla por lo que se recomienda hacerle un seguimiento a la incidencia de esta bacteriosis en cultivos de cebolla del país y en caso de ser un problema recurrente en los cultivos, buscar el origen de la contaminación.

**Palabras clave:** Enterobacterias, *Allium cepa* L., susceptibilidad a antibióticos, biopelícula.

Recibido el 08-11-2013 ● Aceptado el 15-07-2015.

Autor de correspondencia e-mail: marodrig@usb.ve; marodrig@usb.ve

Laboratorio de Genética Molecular. Dpto. de Biología Celular. Universidad Simón Bolívar. Apartado Postal 89000. Caracas 1080-A. Venezuela. Tel.:+58-212-9064213 Fax:+58-212-9063061.

## Abstract

Several bacterial species of the genera *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter* and *Burkholderia*, are known to produce soft rot in onion (*Allium cepa* L.). The aim of the present study was to identify the bacterial species causing soft rot in onion bulbs commercially available from local supermarkets. Biochemistry characterization of isolates was performed using the API20E gallery, and DNA sequencing of a PCR amplified fragment of the 16S ribosomal RNA gene was used for molecular characterization. In addition, the susceptibility of the isolates to different antibiotics and the capacity to form a biofilm was performed. The results showed that the isolate CP1 reproduce the disease symptoms. Biochemistry and molecular characterization showed 97.9% and 99% identity to *Klebsiella pneumoniae* respectively. In addition CP1 showed resistance to ampicillin, gentamicin, tobramycin, streptomycin, kanamycin, trimethoprim and tetracycline. The broad spectrum of resistance to antibiotics, as well as the observed formation of a strong biofilm, may be suggesting a non-environment origin of the isolate. *Klebsiella pneumoniae* is an important pathogen of animals and humans, with a broad distribution on the environment and plants, where it has been isolated as an endophyte with a capacity to fix nitrogen. This is the first report of *K. pneumoniae* as a pathogen of onion. Further studies are recommended on the incidence of this plant bacterial disease and if it is persistent, to find out the source of contamination.

**Key words:** Enterobacteria, *Allium cepa* L., antibiotic susceptibility, biofilm.

## Introducción

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una planta herbácea que pertenece a la familia de las Liliaceae, oriunda de Asia, que ocupa uno de los primeros lugares en la producción mundial dentro del grupo de las hortalizas (FAOSTAT, 2013). En Venezuela, es la hortaliza con mayor producción, alcanzando una superficie cosechada de 18.088 hectáreas para el año 2012 según reportes de Fedegro. La cebolla es atacada por una gran variedad de patógenos, siendo los bacterianos los que producen las mayores pérdidas económicas durante la cosecha, el almacenamiento y en la cadena de distribución del producto (Shock *et al.*, 1998; Beer *et al.*, 2012). Las

## Introduction

Onion (*Allium cepa* l.) is an herbaceous plant belonging to the Liliaceae family, native of Asia, which occupies one of the first places in the world production within the group of vegetables (FAOSTAT, 2013). In Venezuela, onion is the vegetable with greater production, reaching a harvested area of 18.088 hectares in 2012 according to Fedegro. Onion is attacked by a variety of pathogens, being the bacteria the ones that produce the greatest economic losses during the harvest, storage and distribution of the product chain (Shock *et al.*, 1998; Beer *et al.*, 2012). The bacterial disease described in onion produce varied symptoms that cause

bacteriosis descritas en cebolla producen síntomas variados que causan lesiones en las hojas, tallo y bulbo. En el follaje se han detectado lesiones acuosas, clorosis y necrosis producidas por *Xanthomonas campestris* (Nunez *et al.*, 2002), *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Roumagnac *et al.*, 2004) y *Pantoea ananas* (Gitaitis y Gay, 1997). Las bacteriosis que afectan los bulbos producen maceración y pudriciones y son causadas por diferentes patógenos como: *Burkholderia cepacia* Complex (Jacobs *et al.*, 2008), *Pantoea ananitas* (Schwartz y Otto, 2000), *Enterobacter cloacae* (Bishop y Davis, 1990) y *Serratia plymuthica* (Kowalska *et al.*, 2011). En Venezuela, Martínez (2000) reportó que investigaciones realizadas por el FONAIAP, UCLA y UCV han encontrado patógenos como *Xanthomonas campestris*, *Pantoea ananas*, *Pseudomonas viridiflava* y diferentes especies de *Erwinias*, asociados a cebolla, produciendo lesiones en bulbos y hojas.

*Klebsiella pneumoniae* no se ha reportada en cebollas, aun cuando se la ha encontrado en diversos ambientes como suelos, aguas de consumo y residuales, en plantas (Bagley, 1985; Brown y Seidler, 1973), y presente en las superficies mucosas de mamíferos, colonizando el tracto digestivo de animales y humanos. También se la ha identificado como patógeno oportunista asociado con un gran número de infecciones intrahospitalarias (Podschn y Ullmann, 1998), usualmente precedidas por la colonización del patógeno y la formación de biopelículas que le permiten la adhesión a diferentes tejidos produciendo infecciones severas intra-abdominales,

damage on the leaves, stem and bulb. It has been observed aqueous injuries, chlorosis, and necrosis in the foliage produced by *Xanthomonas campestris* (Nuñez *et al.*, 2002), *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Roumagnac *et al.*, 2004) and *Pantoea ananas* (Gitaitis and Gay, 1997). The bacterial disease that affect the bulbs produce maceration and putrefactions and are caused by different pathogens like: *Burkholderia cepacia* Complex (Jacobs *et al.*, 2008), *Pantoea ananitas* (Schwartz and Otto, 2000), *Enterobacter cloacae* (Bishop and Davis, 1990) and *Serratia plymuthica* (Kowalska *et al.*, 2011). In Venezuela, Martínez (2000) reported that researches carried out by the FONAIAP, UCLA and UCV have found pathogens such as *Xanthomonas campestris*, *Pantoea ananas*, *Pseudomonas viridiflava* and different *Erwinias* species associated with onion, producing lesions in bulbs and leaves. *Klebsiella pneumoniae* has not been reported in onions, even when it has been found in different environments such as soil, drinking water and sewage, in plants (Bagley, 1985; Brown and Seidler, 1973), and present in the mucosal surfaces of mammals, colonizing the digestive tract of animals and humans. It has also been identified as an opportunistic pathogen associated with a large number of nosocomial infections (Podschn and Ullmann, 1998), usually preceded by the colonization of the pathogen and the biofilms formation that will allow the adherence to different tissues producing severe intra-abdominal infections, urinary tract, pneumonia, mastitis in cattle (Muñoz *et al.*, 2007;

del tracto urinario, neumonías, bacteremias, mastitis en ganado bovino (Munoz *et al.*, 2007; Ahmed y Shimamoto, 2011) y colonizando superficies abióticas de catéteres y sondas (Ko *et al.*, 2002; Di Martino *et al.*, 2003). La capacidad de resistir a la desecación, la presencia de exopolisacáridos, adhesinas y fimbrias que le permiten la formación de biopelícula, así como la resistencia a los antimicrobianos presentes en la mayoría de los aislados clínicos, hacen de *K. pneumoniae* el patógeno clínico más importante del género *Klebsiella* (Jadhav *et al.*, 2012). *K. pneumoniae* no se ha reportado como patógeno de plantas, sin embargo, se ha descrito su capacidad de colonizar, como endófita, una gran variedad de cultivos como: maíz, soya, arroz, alfalfa, entre otros (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2003; Chelius *et al.*, 2000). El propósito de este trabajo fue caracterizar bioquímica y molecularmente (16S ARNr) un aislado obtenido de lesiones en bulbos de cebolla, determinar su susceptibilidad a antibióticos y la capacidad de formar biopelícula como posible mecanismo de colonización.

## Materiales y métodos

### Aislamiento bacteriano y ensayos de patogenicidad en cebolla

Los bulbos de cebolla con signos de podredumbre blanda fueron adquiridos en supermercados locales en Caracas. Se tomaron trozos del tejido que presentaban lesiones y se disgregaron con un bisturí estéril en solución salina estéril (NaCl 0,85% p/v). De allí se

Ahmed and Shimamoto, 2011) and colonizing abiotic surfaces of probes and catheters (Ko *et al.*, 2002; Di Martino *et al.*, 2003). The ability to withstand desiccation, the presence of exopolysaccharides, adhesins and fimbriae that allow the biofilms formation, as well as the antimicrobial resistance present in most of the clinical isolates, make *K. pneumoniae* the more important clinical pathogen the *Klebsiella* genre (Jadhav *et al.*, 2012). *K. pneumoniae* has not been reported as a plant pathogens; however, it has been described its ability to colonize, as an endophyte, a wide variety of crops such as corn, soy, rice, alfalfa, among others (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2003; Chelius *et al.*, 2000). The aim of this research was to characterize biochemistry and molecularly (16S ARNr) an isolate obtained from lesions in onion bulbs, to determine its susceptibility to antibiotics and the ability to form biofilms as a possible colonization mechanism.

## Materials and methods

### Bacterial isolation and pathogenicity tests in onion

The onion bulbs with signs of soft rot were acquired in local supermarkets in Caracas. Pieces of the tissue that presented the lesions were taken and desegregated with a sterile scalpel in sterile saline solution (NaCl 0.85% w/v). The inoculum was taken and planted by depletion in agar Luria-Bertani-LB (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl and 1.5% agar) and was incubated at 30°C for 24-48 hours. The colonies were chimed

tomó un inóculo, se sembró por agotamiento en placas con agar Luria-Bertani-LB (1% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl y 1,5% de agar) y se incubaron a 30°C por 24-48 horas. Las colonias fueron repicadas individualmente en el mismo medio hasta asegurar su pureza y se le realizaron las pruebas de patogenicidad en cebolla. Para esas pruebas se tomaron bulbos de cebolla blanca que fueron esterilizados en etanol al 70%, se lavaron en hipoclorito de sodio al 1% por 2 minutos y posteriormente tres veces con agua destilada estéril. Los cultivos bacterianos puros se prepararon a una concentración de  $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup> en solución salina, utilizando los patrones de la escala de McFarland (bioMerieux. Inc.) y se inyectaron 0,2 mL en cebolla. Se incluyó un control negativo de solución salina estéril. Los bulbos fueron incubados a 32-34°C en una incubadora con iluminación diurna (VWR International, Oregón) por 2 semanas, luego fueron cortados longitudinalmente y el aislado que presentó los síntomas de maceración con manchado oscuro fue reaislado y se le determinó nuevamente la patogenicidad en cebolla.

### **Caracterización fisiológica, bioquímica y molecular del aislado**

Para la caracterización del aislado se practicaron las siguientes pruebas: tinción Gram, crecimiento a diferentes temperaturas 30, 37 y 44,5°C, motilidad en medio LB con agar al 0,5%, crecimiento en medio Hugh y Leifson y las pruebas bioquímicas con la galería API 20E (bioMerieux. Inc). La identidad molecular se realizó aislando el ADN genómico mediante la

individualmente en el mismo ambiente para asegurar su pureza, y las pruebas de patogenicidad en cebolla se realizaron. Para esas pruebas se tomaron bulbos de cebolla blanca que fueron esterilizados en etanol 70% y se lavaron en hipoclorito de sodio al 1% por 2 minutos y luego tres veces con agua destilada estéril. Los cultivos bacterianos puros se prepararon a una concentración de  $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup> en solución salina utilizando los patrones de McFarland (bioMerieux. Inc.) y 0,2 mL se inyectó en cebolla. Se incluyó un control negativo de solución salina estéril. Los bulbos fueron incubados a 32-34°C en un incubador con iluminación diurna (VWR International, Oregón) por 2 semanas, luego fueron cortados longitudinalmente y el aislado que presentó síntomas de maceración con manchado oscuro fue reaislado y se le determinó nuevamente la patogenicidad en cebolla.

### **Physiologic, biochemical and molecular characterization of the isolation**

The following tests were performed for the characterization of the isolated: Gram stain, growth at different temperatures 30, 37 and 44.5°C, motility in LB medium with agar at 0.5%, growth in Hugh and Leifson medium and biochemical tests with the gallery API 20E (bioMerieux. Inc). The molecular identity was performed isolating the genomic DNA using the Chen and Kuo (1993) methodology and amplifying the sequence of the RNA gene by PCR ribosomal reaction 16S using the universal primers U1 and U2 (Lu *et al.*, 2000). The reaction was carried out in a final volume of 25 µL containing 0.2 µM of each of the primers, 200 µM of

metodología de Chen y Kuo (1993) y amplificando mediante la reacción de PCR la secuencia del gen ARN ribosomal 16S usando los cebadores universales U1 y U2 (Lu *et al.*, 2000). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L conteniendo 0,2  $\mu$ M de cada uno de los cebadores, 200  $\mu$ M de los deoxinucleótidos (dNTPs), 10 mM Tris-HCL (pH 8,4), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U GoTaq® Flexi DNA polimerasa de Promega y 100 ng del ADN templado. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador PT-100 M J Research, programado con 10 minutos de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de 60 minutos a 94°C, 60 segundos de alineamiento a 55°C y dos minutos de extensión a 73°C, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. El fragmento amplificado fue purificado usando el kit de Axygen (AxyPrep™ PCR Cleanup kit) y secuenciado en la unidad de genómica del IDEA. La secuencia de nucleótidos fue analizada usando DNAMAN y el NCBI BLAST para comparar la secuencia contra la base de datos del GenBank.

### **Formación de biopelícula y patrón de resistencia a antibióticos**

Para la determinación de la formación de biopelícula se utilizó el protocolo descrito por O'Toole y Kolter (1998), partiendo de un cultivo de 18 horas. Se realizaron diluciones (1:100) en caldo fresco LB (1% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura y 0,5% NaCl), se sembraron 100  $\mu$ L en pozos de una placa de policloruro de vinilo (PCV) por triplicado y se incubaron las muestras por 24 horas a 30°C. Las células planctónicas se eliminaron lavando la placa con abundante agua desti-

the deoxynucleotides (dNTPs), 10 mM Tris-HCL (pH 8.4), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U GoTaq® Flexi DNA Promega polymerase and 100 ng of tempered DNA. The amplification reaction was carried out in a thermal cycler, PT-100 M J Research, scheduled 10 minutes of denaturalization at 94°C, 35 cycles of 94°C 60 minutes, 60 seconds of alignment at 55°C and two-minute extension at 73°C, with a final extension at 72°C for 10 minutes. The amplified fragment was purified using kit Axygen (AxyPrep™ PCR Cleanup kit) and sequenced in the genomics of the IDEA unit. The nucleotide sequence was analyzed using DNAMAN and NCBI BLAST to compare the sequence against the GenBank database.

### **Biofilm formation a resistant pattern to antibiotics**

For determining the biofilm formation, the protocol described by O'Toole and Kolter (1998) was used, on the basis of an 18-hour crop. Dilution (1:100) were done in LB fresh medium (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract and 0.5% NaCl), 100  $\mu$ L were sowed in wells of polyvinyl chloride (PCV) plate by in triplicate, and the samples were incubated for 24 hours at 30°C. The planktonic cells were removed by washing the plate with distilled water and letting it dry it at room temperature. Attached cells were stained with 200  $\mu$ L of Crystal Violet 0.1% for 20 minutes, and then the plate was washed three times with distilled water and dried at room temperature. Retained coloring was revealed by adding 200  $\mu$ L of a solution of glacial acetic acid to 30% and the absorbance (OD) was measured at 595 nm in a microplate (BioRad, model

lada y secándola a temperatura ambiente. Las células adheridas fueron teñidas con 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta al 0,1% por 20 minutos, luego se lavó la placa tres veces con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. El colorante retenido se reveló agregando 200  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido acético glacial al 30% y se midió la absorbancia (DO) a 595 nm en un lector de microplacas (BioRad, modelo IMARK). La cuantificación de la biopelícula se realizó según la metodología de Stepanoviæ *et al.* (2000) que clasifica la formación de biopelícula en varias categorías: no adherente ( $\text{OD} \leq \text{ODc}$ ), poco adherente ( $\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \text{ X ODc}$ ), moderadamente adherente ( $2 \text{ X ODc} < \text{OD} \leq 4 \text{ X ODc}$ ) y fuertemente adherente ( $4 \text{ X ODc} < \text{OD}$ ), estableciendo como punto de corte (DOc) tres desviaciones estándar del promedio de la DO del control negativo (medio de cultivo no inoculado). El ensayo se realizó dos veces por triplicado.

La susceptibilidad a antimicrobianos se determinó por el método de difusión por discos siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009), sembrando un césped bacteriano ( $1 \times 10^8$  células. $\text{mL}^{-1}$ ) en agar Mueller-Hinton (Oxoid) y colocando sobre él los discos de antibióticos comerciales (BBL™ Sensi Disc™ Antimicrobial). Se utilizó gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ), amikacina (30  $\mu\text{g}$ ), tobramicina (10  $\mu\text{g}$ ), estreptomycin (30  $\mu\text{g}$ ), trimetoprim (5  $\mu\text{g}$ ), tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ), ampicilina (10  $\mu\text{g}$ ), cefoperazona (75  $\mu\text{g}$ ), piperacilina (100  $\mu\text{g}$ ) y el antibiótico imipenen (10  $\mu\text{g}$ ) que fue preparado del fármaco liofilizado en agua estéril para obtener una concentración fi-

MARK) reader. The quantification of the biofilm was performed according to the methodology of Stepanoviæ *et al.* (2000) that classify the biofilm formation under several categories: not adherent ( $\text{OD} \leq \text{ODc}$ ), little adherent ( $\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \text{ X ODc}$ ), moderately adherent ( $2 \text{ X ODc} < \text{OD} \leq 4 \text{ X ODc}$ ) and hard adherent ( $4 \text{ X ODc} < \text{OD}$ ), establishing as cut-off point (DOc) three standard deviations of the average of the DO of the negative control (non inoculated medium). The essay was done two times by triplicate. The antimicrobial susceptibility was determined by the diffusion method following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009), planting a bacterial lawn ( $1 \times 10^8$  cells. $\text{mL}^{-1}$ ) in Mueller-Hinton agar (Oxoid) and putting on it the disks of commercial antibiotics (BBL™ Sensi Disc™ Antimicrobial). Gentamicin (10  $\mu\text{g}$ ), amikacin (30  $\mu\text{g}$ ), tobramycin (10  $\mu\text{g}$ ), streptomycin (30  $\mu\text{g}$ ), trimethoprim (5  $\mu\text{g}$ ), tetracycline (30  $\mu\text{g}$ ), ampicillin (10  $\mu\text{g}$ ), cefoperazone (75 mg), piperacillin (100  $\mu\text{g}$ ) and the antibiotic imipenen (10  $\mu\text{g}$ ) were used, prepared from the drug lyophilized in sterile water to obtain a final concentration of 1  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  and evaluated using Wathman filter paper discs N° 1 of 6 mm in diameter. Antimicrobial susceptibility was interpreted according to the criteria for inhibition zone diameter referred in the document M100-S21 of the CLSI (2011), reporting as susceptible (S) or resistant (R).

## Results and discussion

Three types of phenotypically different gram negative colonies were initially isolated. In onion, only one

nal de  $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  y evaluado utilizando discos de papel de filtro Wathman N° 1 de 6 mm de diámetro. La susceptibilidad antimicrobiana se interpretó de acuerdo a los criterios para diámetro de zona de inhibición referidos en el documento M100-S21 del CLSI (2011), reportando como susceptible (S) o resistente (R).

## Resultados y discusión

Se aislaron inicialmente tres tipos de colonias Gram negativas fenotípicamente diferentes, que cuando se inocularon en cebolla, sólo una (aislado CP1) de color crema y aspecto mucoso, reprodujo los síntomas de maceración y el cambio de coloración del bulbo (figura 1) similares a los ocasionados por *Enterobacter cloacae* en cebollas (Bishop y Davis, 1990; Shroeder y du Toit, 2010). El aislado recuperado de bulbos infectados reprodujo los síntomas en sucesivos ensayos de patogenidad cumpliendo con los postulados de Koch. El aislado CP1 presentó forma de bacilo, reacción Gram negativa, crecimiento a 30, 37 y 45°C, dio negativo en la prueba de motilidad y se comportó como anaerobio facultativo. Las pruebas bioquímicas del API 20E que se presentan en el cuadro 1 resultaron con el código 521577317, caracterizando al aislado CP1 como *Klebsiella pneumoniae* con un 99,7% de identidad. De igual forma, la comparación de la secuencia del gen ARN ribosomal 16S contra la base del GenBank le dio una identificación del 99% con *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* la cual no presenta motilidad y se diferencia de los de-

(isolated CP1) of cream color and mucous aspect, reproduced the maceration and the discoloration symptoms of the bulb (figure 1) similar to those caused by *Enterobacter cloacae* in onions (Bishop and Davis, 1990; Schroeder and du Toit, 2010). The isolated recovered from infected bulbs reproduced the symptoms in successive pathogenicity tests fulfilling Koch's postulates. Isolated PC1 appeared as Bacillus, Gram negative reaction, growth at 30, 37 and 45°C, showed up negative in motility test and behaved as a facultative anaerobic. The API 20E biochemical tests which are presented in table 1 were with code 521577317, characterizing the isolated CP1 as *Klebsiella pneumoniae* with 99.7% of identity. Similarly, the sequence comparison of the RNA ribosomal 16S gene against the GenBank provided an identification of 99% with *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* belongs to the Enterobacteriaceae family which does not have motility and differs from other members of the genre *Klebsiella* in the fact that it can grow at 44-45°C; It is a widely distributed bacteria in the environment, found in the bark of trees, sugar cane waste (Bagley *et al.*, 1978) colonizing potatoes and lettuce (Knittel *et al.*, 1977). The biofilm formation in the experiments with LB medium produced an average DO of  $0.932\pm 0.074$ , while the control experiments averaged  $0.049\pm 0.003$ . According to the biofilm classification of Stepanoviæ *et al.* (2000) these results can be classified as strongly adherent biofilm since the DOc had a value of 0.228. Similar results were observed using different culture medium such





**Figura 1. Síntomas de pudrición interna en cebolla inoculada con *K. pneumoniae* CP1 después de 2 semanas de incubación. A: bulbo inoculado con 0,2 mL ( $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>). B: control inyectado con solución salina.**

**Figure 1. Symptoms of internal rot in onions inoculated with *k. pneumoniae* CP1 after 2 weeks of incubation. A: bulb inoculated with 0.2 mL ( $1 \times 10^8$  cells.mL<sup>-1</sup>). B: control injected with saline solution.**

más miembros del género *Klebsiella* en que puede crecer a 44-45°C; es una bacteria de una amplia distribución en el ambiente, encontrada en cortezas de árboles, desechos de caña de azúcar (Bagley *et al.*, 1978) y colonizando papas y lechugas (Knittel *et al.*, 1977).

La formación de biopelícula en los experimentos con medio LB produjo una DO promedio de  $0,932 \pm 0,074$ , mientras que el promedio de los experimentos control fue de  $0,049 \pm 0,003$ . Según la clasificación de formación de biopelícula de Stepanoviæ *et al.* (2000) estos resultados pueden clasificarse como biopelícula fuertemente adherente ya que el DOc dió un valor de 0,228. Resultados similares fueron observados cuando se utilizaron diferentes

as as YPD (0.5% yeast extract, 0.5% peptone and 0.5% dextrose) and the minimum medium M9 (data not shown). The ability of this opportunistic pathogen to survive in different environments, of causing disease and adhere to various surfaces, depends on their ability to form biofilms or communities that are embedded in a matrix of exopolysaccharides and proteins, which protect them from the external conditions and the action of detergents, antibiotics and the immune defenses of the host. There are several genes involved in the pathogenicity and biofilm formation of *k. pneumoniae* among which are the production of exopolysaccharides and

**Cuadro 1. Perfil bioquímico mediante el sistema API 20E del aislado bacteriano CP1 obtenido de bulbos de cebolla.****Table 1. Biochemical profile by the API 20E system of the bacterial CP1 isolate obtained from onion bulbs.**

Test	Enzimas/Prueba	Reacción
ONPG	B-galactosidasa	+
ADH	Arginina deshidrolasa	-
LDC	Lisina descarboxilasa	+
ODC	Ornitina descarboxilasa	-
CIT	Utilización de citrato	+
H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S	-
URE	Ureasa	+
TDA	Triptófano desaminasa	-
IND	Producción de indol	-
VP	Producción de acetoína	+
GEL	Gelatinasa	-
GLU	Fermentación/oxidación (glucosa)	+
MAN	Fermentación/oxidación (manitol)	+
INO	Fermentación/oxidación (inositol)	+
SOR	Fermentación/oxidación (sorbitol)	+
RHA	Fermentación/oxidación (ramnosa)	+
SAC	Fermentación/oxidación (sacarosa)	+
MEL	Fermentación/oxidación (melobiosa)	+
AMY	Fermentación/oxidación (amigdalina)	+
ARA	Fermentación/oxidación (arabinosa)	+
OX	Citocromo oxidasa	-
O/F-O	Oxidación de la glucosa	+
O/F-F	Fermentación de la glucosa	+

medios de cultivo como YPD (0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona y 0,5% dextrosa) y el medio Mínimo M9 (datos no mostrados). La habilidad de este patógeno oportunista de sobrevivir en diferentes ambientes, de causar enfermedad y adherirse a diversas superficies, depende de su capacidad de formar biopelícula o comunidades que se encuentran embebidas en una matriz de exopolisacáridos y proteínas, que las protege de las condiciones ex-

lipopolysaccharide, capsule formation and the type 3 and type 1 fimbriae expression (Boddicker *et al.*, 2006; Stahlhut *et al.*, 2010). The infections produced by the formation of biofilms are difficult to treat with antimicrobials because they cannot penetrate to the infection and control the bacterial growth. Studies with strains of *k. pneumoniae* with nosocomial origin as well as environmental isolates, including the

ternas como la acción de detergentes, antibióticos y de las defensas inmunológicas del hospedero. Varios son los genes involucrados en la patogenicidad y formación de la biopelícula en *K. pneumoniae* entre los que se encuentran la producción de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, formación de la cápsula y la expresión de la fimbria tipo 3 y tipo 1 (Boddicker *et al.*, 2006; Stahlhut *et al.*, 2010). Las infecciones producidas por la formación de biopelícula son difíciles de tratar con agentes antimicrobianos debido a que no pueden penetrar a la misma y controlar el crecimiento bacteriano. Estudios realizados con cepas de *K. pneumoniae* de origen nosocomial así como aislados ambientales, incluyendo la cepa endofítica *K. pneumoniae* 342 (Fouts *et al.*, 2008), indicaron ser casi idénticos en cuanto a la expresión de los factores de virulencia como los polisacáridos de la cápsula, los lipopolisacáridos, las adhesinas que favorecen la formación de biopelícula y la resistencia al suero humano, entre otros (Podschun *et al.*, 2001), diferenciándose solo en la resistencia a antimicrobianos que fueron casi exclusivos de las cepas de origen hospitalario, siendo las cepas ambientales solo resistentes a la ampicilina (Struve y Krogfelt, 2004). La susceptibilidad a los antimicrobianos que se muestran en el cuadro 2, indica que de los  $\beta$ -lactámicos ensayados: ampicilina, imipenem, piperacilina y cefoperazona, el aislado CP1 presentó resistencia solo a la ampicilina y fue susceptible a los otros tres antibióticos. La resistencia a la ampicilina se produce por la acción de la enzima  $\beta$ -lactamasa que hidroliza el anillo lactámico del anti-

*k. pneumoniae* 342 (Fouts *et al.*, 2008), indicado to be almost identical in terms of the expression of virulence factors such as the polysaccharides capsule, lipopolysaccharides, adhesins that favor the formation of biofilm and human serum resistance, among others (Podschun *et al.*, 2001), differing only in the antimicrobial resistance which were almost exclusive to strains of hospital source, being the environmental strains only resistant to ampicillin (Struve and Krogfelt, 2004). The susceptibility to antimicrobials that are shown in table 2, indicates that the tested  $\beta$ -lactams: ampicillin, imipenem, piperacillin and cefoperazone, isolated PC1 showed resistance to ampicillin and was susceptible to the other three antibiotics. Ampicillin resistance is produced by the action of the enzyme  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes the lactam antibiotic ring and is common in almost all *Klebsiella* strains reported in the literature due to the presence of a chromosomal gene that encodes the  $\beta$ -lactamase enzyme (blaAmpC) or resident genes in plasmids (Kumar *et al.*, 2011). On the other hand, Imipenem is a broad spectrum of the carbapenems group  $\beta$ -lactam, piperacillin is an extended-spectrum  $\beta$ -lactam and cefoperazone is a third generation cephalosporin whose resistance mechanisms not only depend on the expression of the  $\beta$ -lactamase but also on other mechanisms such as the closure of the porins and the exaggerated expression of expulsion pumps (Nikaido and Pagès, 2012). From the aminoglycoside antibiotics tested group: kanamycin, tobramycin, gentamicin and

**Cuadro 2. Perfil de susceptibilidad a antibióticos del aislado bacteriano CP1 obtenido de bulbos de cebolla.**

**Table 2. Susceptibility profile to antibiotics of the bacterial PC1 isolate obtained from onion bulbs.**

Antibiótico	$\mu$ /mL	Susceptibilidad	Clasificación
Ampicilina	10	R	$\beta$ - lactámico
Imipenem	10	S	$\beta$ - lactámico- grupo carbapenen
Piperacilina	100	S	$\beta$ - lactámico-grupo ureidopenicilina
Cefoperazona	75	S	$\beta$ - lactámico-grupo cefalosporina
Kanamicina	30	R	Aminoglucósido
Tobramicina	10	R	Aminoglucósido
Estreptomicina	10	R	Aminoglucósido
Gentamicina	10	R	Aminoglucósido
Amikacina	30	S	Aminoglucósido
Trimetoprim	5	R	Diaminopirimidina
Tetraciclina	30	R	Tetraciclina

R: resistencia, S: sensibilidad

biótico y es común en casi todas las cepas de *Klebsiella* reportadas en la literatura debido a la presencia de un gen cromosomal que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa (*blaAmpC*) o a genes residentes en plásmidos (Kumar *et al.*, 2011). Por otro lado Imipenem es un  $\beta$ -lactámico de amplio espectro del grupo de los carbapenemas, piperacilina es un  $\beta$ -lactámico de espectro extendido y cefoperazona es una cefalosporina de tercera generación cuyos mecanismos de resistencia no solo dependen de la expresión de la  $\beta$ -lactamasa sino también de otros mecanismos como el cierre de las porinas y la expresión exagerada de las bombas de expulsión (Nikaido y Pagès, 2012). Del grupo de antibióticos aminoglucósidos ensayados: kanamicina, tobramicina, estreptomicina, gentamicina y

streptomycin, amikacin, CP1 was resistant to all except to amikacin, which is a semi-synthetic derivative of kanamycin A, that is the reason it is known as the reserve aminoglycoside. The strain was also resistant to the antibiotics tetracycline and trimethoprim. The sequences analysis of six genomes of *K. pneumoniae* present in the GenBank database allowed Kumar *et al.* (2011) to make an inventory of the genes that could be involved in various mechanisms that cause resistance to antimicrobial agents, finding that only one strain of hospital origin (1162281) presented resistance genes for the  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, chloramphenicol, trimethoprim. The *tetD* gene that confers resistance to tetracycline is only found in multidrug-resistant strain

amikacina, CP1 resultó resistente a todos menos a la amikacina, que es un derivado semisintético de la kanamicina A, por lo que se le conoce como el aminoglucósido de reserva. La cepa también resultó resistente a los antibióticos tetraciclina y trimetoprim. El análisis de la secuencias de seis genomas de *K. pneumoniae* presentes en la base de datos GenBank le permitió a Kumar *et al.* (2011) hacer un inventario de los genes que podrían intervenir en los diversos mecanismos que causan resistencia a los antimicrobianos, encontrando que solo una cepa de origen hospitalario (1162281) presentó genes de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol y trimetoprim. El gen *tetD* que confiere resistencia a tetraciclina se encontró solo en la cepa multirresistente MGH78578. El genoma del aislado ambiental *K. pneumoniae* 342 presentó dos secuencias para  $\beta$ -lactamasas y varios genes de bombas de excreción comunes en todos los genomas analizados, concluyendo que la prevalencia de la resistencia en las cepas de diferentes orígenes y con un variado espectro de resistencia no es clonal, pudiendo ser producto de la transferencia horizontal de genes mediante plásmidos o elementos móviles (transposones o integrones), fenómeno muy común entre las Enterobacterias (Kumar *et al.*, 2011). Muchos son los factores que inciden en la resistencia bacteriana destacándose el uso indiscriminado de antibióticos en aplicaciones hospitalarias y en veterinaria, su uso en alimentos de animales y la acumulación de bacterias entéricas resistentes en

MGH78578. The genome of isolated environmental *k. pneumoniae* 342 presented two sequences for  $\beta$ -lactamases and several pump excretion genes of common in all the analyzed genomes, concluding that the prevalence of resistance in strains of different origins and with a diverse spectrum of resistance is not clonal, and may be caused by the horizontal transfer of genes by plasmid or mobile (transposons or integrons) elements, very common phenomenon among enterobacteriaceae (Kumar *et al.*, 2011). There are many factors that affect the bacterial resistance highlighting the indiscriminate use of antibiotics in hospital applications and in veterinary medicine, its use in food of animals and the accumulation of enteric bacteria resistant in animal manure, in effluent and sewage (Brown *et al.*, 2006), thus contributing to the spread of resistance genes in the ecosystem. The bacterial ability of horizontal transmission of these genes located on plasmids, transposons and integrons, as well as the plasmid transfer among the bacteria when forming biofilms, promote the increase of resistance among bacterial groups (Burmølle *et al.*, 2008). Enterobacteriaceae such as *Klebsiella* that are able to adapt to a variety of environments that has remained as endophyte in plants (Holden *et al.*, 2009) and that can also be transmitted through the food chain represent a risk to the health; since it constitutes a reservoir of antimicrobial resistance genes. The emergence of the isolated CP1 resistant to antimicrobials for clinical use and its ability to form a strongly adherent biofilm, as well as

abono de origen animal, en efluentes y aguas residuales (Brown *et al.*, 2006), contribuyendo así a la diseminación de genes de resistencia en el ecosistema. La capacidad bacteriana de transmisión horizontal de estos genes localizados en plásmidos, transposones e integrones, así como la transferencia de plásmidos entre las bacterias cuando forman biopelículas, promueven el incremento de resistencia entre grupos bacterianos (Burmølle *et al.*, 2008). Enterobacterias como *Klebsiella* que tienen la capacidad de adaptarse a una gran variedad de ambientes, que se ha mantenido como endófito en plantas (Holden *et al.*, 2009) y que además puede ser transmitida a través de la cadena alimenticia representa un riesgo a la salud ya que se constituye en reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos. La aparición del aislado CP1 resistente a antimicrobianos de uso clínico y su capacidad de formar una biopelícula fuertemente adherente así como la colonización de un nuevo nicho debe alertarnos sobre el manejo y cultivo de cebolla en el país y las posibles fuentes de contaminación.

## Conclusiones

El microorganismo causante de podredumbre blanda en bulbos de cebolla fue identificado como *K. pneumoniae*, siendo este el primer reporte como patógeno de cebolla.

## Agradecimiento

Los autores agradecen el apoyo técnico de la Ing. Yhendy García.

the colonization of a new niche should alert people about the handling and cultivation of onions in the country and possible source of contamination.

## Conclusions

The causative organism of soft rot in onion bulbs was identified as *K. pneumoniae*, as this is the first report as a pathogen of onion.

## Acknowledgment

The authors thank the technical support of Eng. Yhendy García.

*End of english version*

---

## Literatura citada

- Ahmed, A.M. y T. Shimamoto. 2011. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiol. Immunol.* 55(5):318–327.
- Bagley, S.T., R.J. Seidler, H.W. Talbot, J.R. y J.E. Morrow. 1978. Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(1):178–185.
- Bagley, S.T. 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control* 6(2):52–58.
- Beer, S.V., J.E. Asselin, J.M. Bonasera, A.M. Zaid y C.A. Hoeping. 2012. Research yields greater understanding of bacterial diseases of onion in New York. *Onion World* 18–23.
- Bishop, A.L. y R.M. Davis. 1990. Internal decay of onions caused by *Enterobacter cloacae*. *Plant Dis.* 74(9):692–694.
- Boddicker, J.D., R.A. Anderson, J. Jagnow y S. Clegg. 2006. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella*

- pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect. Immun.* 74(8):4590–4597.
- Brown, C y R.J. Seidler. 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Microbiol.* 25(6):900-904.
- Brown, K.D., J. Kulis, B. Thomson, T.H. Chapman y D.B. Mawhinney. 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* 366(2):772–783.
- Burmølle, M., M.I. Bahl, L.B. Jensen, S.J. Sørensen y L.H. Hansen. 2008. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains. *Microbiol.* 154(1):187-195.
- CLSI. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard- Tenth edition, CLSI document M02-A10. Wayne, P.A. Clinical and Laboratory Standard Institute 26(1): 4-13, 23-25, 27-32.
- CLSI. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility test; approved standard- Twenty-first informational supplement, CLSI document M100-S21. Wayne, P.A. Clinical and Laboratory Standard Institute. 31(1): 32-33, 42-46.
- Chelius, M.K. y E.W. Triplett. 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2):783-787.
- Chen, W. y T. Kuo. 1993. A simple rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucl. Acid Res.* 21(9): 2260.
- Di Martino, P., N. Cafferini, B. Joly y A. Darfeuille-Michaud. 2003. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res. Microbiol.* 154(1): 9-16.
- Dong, Y., A.L. Iniguez y E.W. Triplett. 2003. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 257(1):49-59.
- FAOSTAT. <http://www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consultado en Mayo 2013.
- Fedeagro. <http://www.fedeagro.org/producción/Rubros.asp>. Consultado en Mayo 2013.
- Fouts, D.E., H.L. Tyler, R.T. DeBoy, S. Daugherty, Q. Ren, J.H. Badger, A.S. Durkin, H. Huot, S. Shrivastava, S. Kothari, R.J. Dodson, Y. Mohamoud, H. Khouri, L.F. Roesch, K.A. Krogfelt, C. Struve, E.W. Triplett, y B. A. Methe. 2008. Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* and virulence predictions verified in mice. *PLoS.Genet.* 4:e1000141.
- Gitaitis, R.S. y J.D. Gay. 1997. First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *Plant Dis.* 81(9):1096.
- Holden, N., L. Pritchard y I. Toth. 2009. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 33(4):689–703.
- Jacobs, J.L, A.C. Fasi, A. Ramette, J.J. Smith, R. Hammerschmidt y G.W. Sundin, 2008. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* Complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(10):3121–3129.
- Jadhav, S., R. Misra, N. Gandham, M. Ujagare, P. Ghosh, K. Angadi y C. Vyawahare. 2012. Increasing incidence of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* infections in hospitals and community settings. *Int. J. Microbiol. Res.* 4(6):253-259.
- Knittel, M.D., R.J. Seidler, C. Eby y L.M. Cabe. 1977. Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 34(5):557-563.

- Ko, W.C., D.L. Paterson, A.J. Sagnimeni, D.S. Hansen, A. Von Gottberg, S. Mohapatra, J.M. Casellas, H. Goossens, L. Mulazimoglu, G. Trenholme, K.P. Klugman, J.G. McCormack y V.L. Yu. 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg. Infect. Dis.* 8(2):160-165.
- Kowalska, B., U. Smolinska y M. Oskiera. 2011. First report of *Serratia plymuthica* causing onion bulb rot in Poland. *Polish J. Microbiol.* 60(1):85-87.
- Kuklinsky-Sobral, J., W.L. Araújo, R. Mendes, I.O. Geraldi, A.A. Pizzirani-Kleiner y J. L. Azevedo. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6(12):1244-1251.
- Kumar, V., P. Sun, J. Vamathevan, Y. Li, K. Ingraham, L. Palmer, J. Huang y J.R. Brown. 2011. Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strain with different antibiotic resistance profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(9):4267-4276.
- Lu, J., C. Perng, S. Lee y C. Wan. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Biol.* 38(6): 2076-2080.
- Martínez de Carrillo, M. 2000. Investigación y manejo de la bacteriosis de cebolla en Quibor, Edo Lara. FONAIAP DIVULGA 68:22-24.
- Munoz, M.A., F.L. Welcome, Y.H. Schukken y R.N. Zadoks. 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis Outbreaks on a dairy farm in New York State. *J. Clin. Microbiol.* 45(12):3964-3971.
- Nikaido, H y J-M. Pagès. 2012. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 36(2):340-363.
- Nunez, J.J., R.L. Gilbertson, X. Meng y R.M. Davis. 2002. First report of *Xanthomonas* leaf blight of onion in California. *Plant Dis.* 86(3):330.
- O'Toole, G.A. y R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28(3):449-461.
- Podschun, R. y U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(4): 589-603.
- Podschun, R., S. Pietsch, C. Hiller y U. Ullmann. 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface water and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7): 3325-3327.
- Roumagnac, P., O. Pruvost, F. Chiroleu y G. Hughes. 2004. Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Phytopathology* 94(2):138-146.
- Schroeder, B.K. y L.J. du Toit. 2010. Effects of postharvest onion curing parameters on *Enterobacter* bulb decay in storage. *Plant Dis.* 94: 1425-1430.
- Schwartz, H.F. y K. Otto. 2000. First report of a leaf and bulb decay of onion by *Pantoea ananitis* in Colorado. *Plant Dis.* 84(7):808.
- Shock, C.C., E.B.G. Feibert y L.D. Saunders. 1998. Onion yield and quality affected by soil water potential as irrigation threshold. *Hort. Sci.* 33(7):1188-1191.
- Stahlhut, S.G., C. Schroll, M. Harmsen, C. Struve y K.A. Krogfelt. 2010. Screening for genes involved in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation using a fosmid library. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59(3):521-524.
- Stepanoviæ, S., D. Vukoviæ, I. Dakia, B. Savia y M. Švabiæ-Vlahoviæ. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40:175-179.
- Struve, C. y K.A. Krogfelt. 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ. Microbiol.* 6 (6):584-590.