



Characterization of the degradation potential of xenobiotic compounds by the rhizobacteria *Azospirillum brasiliense*

Caracterización del potencial de degradación de compuestos xenobióticos por la rizobacteria *Azospirillum brasiliense*

María Antonia Cruz-Hernández^{1,2*}, Juan Miguel Jiménez-Andrade², Alberto Mendoza-Herrera¹.

¹Laboratorio Interacción Ambiente Microorganismo, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro s/n Esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, CP. 88710, Cd. Reynosa, Tamaulipas, Mexico.

²Universidad Autónoma de Tamaulipas. Laboratorio de Farmacología. Unidad Académica Multidisciplinaria. Reynosa- Aztlán. Calle 16 y lago de Chapala, Col. Aztlán, CP. 88740, Cd. Reynosa, Tamaulipas, Mexico

*Corresponding author

E-mail address: tonitacruz@gmail.com (M. A. Cruz-Hernández).

Article history:

Received: 14 December 2018 / Received in revised form: 15 February 2019 /

Accepted: 8 March 2019 / Published online: 1 April 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.10>

ABSTRACT

Pollution caused by hydrocarbons represents a risk to the environment. Several studies have focused on finding alternatives to help to prevent hydrocarbon pollution effect. One of them involves the use of native microorganisms capable of persisting on contaminated environments. Therefore, the objective of this work was to analyze the potential of biotypes of *Azospirillum brasiliense* to degrade xenobiotic compounds such as phenanthrene, xylene, toluene and naphthalene. The production of biosurfactants was characterized, and the tolerance to petroleum contaminants was evaluated in vitro, the search for degradation of aromatic compounds related genes was done using the RAST program. The results showed that the strains produced biosurfactants and five of them were selected to test their tolerance to xylene, toluene, phenanthrene and naphthalene. Bacteria show no growth after 216 h incubation at 30 °C. 19 coding sequences were registered

regarding to the degradation of aromatic compounds, 11 of them were associated to the metabolism of central aromatic intermediates and 5 were involved in peripheral catabolic pathways whose function is related to degradation pathways of quinate, benzoate, salicylate, gentisate and toluene.

Keywords: degradation, tolerance, pollution.

RESUMEN

La contaminación ocasionada por hidrocarburos representa un riesgo para el medioambiente. Se han enfocado estudios en la búsqueda de alternativas para contribuir a revertir su efecto. Una de ellas involucra el uso de microorganismos nativos capaces de persistir en ambientes contaminados. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue analizar el potencial de biotipos de *Azospirillum brasiliense* para degradar compuestos xenobióticos como fenantreno, xileno, tolueno y naftaleno. Se caracterizó la producción de biosurfactantes, se evaluó *in vitro* la capacidad de tolerancia a hidrocarburos derivados del petróleo y búsqueda de genes relacionados con la degradación de compuestos aromáticos mediante el programa RAST. Los resultados mostraron que los biotipos produjeron biosurfactantes y se seleccionaron cinco de ellos para realizar ensayos de tolerancia a xileno, tolueno, fenantreno y naftaleno; en los cuales no se observó crecimiento bacteriano después de 216 horas de incubación a 30 °C. Se registraron 19 secuencias codificantes relacionadas con la degradación de compuestos aromáticos; de las cuales 11 están asociadas con el metabolismo de los compuestos intermedios aromáticos centrales y 5 con las vías catabólicas periféricas cuya función se asocia con las rutas de degradación de quinato, benzoato, salicilato, gentisato y tolueno.

Palabras clave: contaminación, degradación, tolerancia.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente en nuestro país existen regiones donde la contaminación por hidrocarburos es un problema, a causa principalmente de las actividades de transformación del petróleo, originando daños al ecosistema del suelo, agua y aire (Höhener & Ponsin, 2013, Fulekar, 2017). A través del uso de microorganismos, se pueden bio-transformar los compuestos tóxicos en productos secundarios de menor toxicidad, o incluso promover la mineralización completa de los hidrocarburos totales del petróleo (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010, Gouma *et al.*, 2014, Abbasian *et al.*, 2015, Zhao *et al.*, 2018). El uso de bacterias se ha preferido debido al amplio espectro de hidrocarburos que pueden degradar (Wolicka *et al.*, 2009, Abbasian *et al.*, 2015). Las bacterias del género *Azospirillum*, se han estudiado ampliamente por su capacidad de promover el crecimiento bacteriano (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000, Kaushal & Wani, 2016, García *et al.*, 2017), y

se sabe que poseen rutas metabólicas versátiles que emplean carbono y nitrógeno; lo que les ha permitido establecerse en ambientes competitivos donde predominan la desecación y la limitación de nutrientes (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009, Pérez-Castañeda *et al.*, 2011). Adicionalmente, existen reportes sobre el aislamiento de cepas de *Azospirillum* en suelos contaminados con hidrocarburos, así como su capacidad de degradar petróleo crudo (Eckford *et al.* 2002, Muratova *et al.*, 2005, Miranda-Martínez *et al.*, 2007, Covarrubias *et al.*, 2012). Por lo cual el objetivo de este trabajo fue caracterizar el potencial biodegradador de hidrocarburos derivados del petróleo de biotipos de *Azospirillum brasiliense*. aislados del Noreste de Tamaulipas.

2. MATERIALES Y METODOS

Para el material biológico se emplearon 17 biotipos de *Azospirillum brasiliense* aislados de la rizosfera de maíz y sorgo del Noreste de Tamaulipas durante los años 2000 a 2002 pertenecientes al Laboratorio Interacción Ambiente Microorganismo del Instituto Politécnico Nacional.

2.1. Evaluación de la producción de biosurfactantes

La caracterización de la producción de biosurfactantes por los biotipos bajo estudio, se realizó a través de la evaluación de la actividad hemolítica de acuerdo a la metodología reportada por Carrillo *et al.* (1996). La síntesis de biosurfactantes de tipo ramnolípidos con el empleo de la técnica reportada por Siegmund & Wagner (1991) y la obtención del Índice de Emulsificación (E24) de acuerdo a lo reportado por Illori (2005) la cual se midió a los 5 y 10 minutos. Cada una de estas pruebas se realizó por triplicado y utilizando como controles las cepas de *Rodococcus ruber* y *Sphingobium yanoikuyae*.

2.2. Evaluación *in vitro* de la capacidad de tolerancia a hidrocarburos derivados del petróleo

La evaluación *in vitro* de los biotipos seleccionados de la tolerancia a fenantreno, tolueno, naftaleno y xileno, se realizó empleando la metodología reportada por González-Paredes (2013). Se preparó una solución stock de 400 ug mL de cada hidrocarburo usando como solvente acetona. Las soluciones se mantuvieron en viales color ámbar para prevenir la foto oxidación del hidrocarburo y se almacenaron a 4 °C para evitar la volatilización del solvente. Se utilizaron matraces de 250 mL los cuales contenían 30 mL de medio líquido Luria Bertani, a éstos se les adicionó por separado cada hidrocarburo a una concentración final de 80 ug mL. Estos se mantuvieron abiertos por media hora en la campana de extracción para que el solvente (Diclorometano) se evaporara. Este procedimiento se realizó para los cuatro compuestos en el estudio. Se inoculó una colonia de cada biotipo en medio TY los cuales fueron incubados en agitación (incubadora SHEL-LAB modelo 1545) durante 24 horas con la finalidad de obtener la biomasa bacteriana. Al finalizar se transfirieron a tubos Eppendorf, se centrifugaron, se

decantó el sobrenadante y se lavó con solución salina estéril, repitiendo el proceso dos veces, se resuspendió la pastilla con solución salina estéril y de este stock se inocularon a una D.O. de \pm 0.05 matraces con 30 mL de medio de cultivo. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.3. Búsqueda de genes en el genoma de *Azospirillum brasilense* relacionados con la degradación de compuestos aromáticos

En este caso se utilizó la secuencia del genoma *Azospirillum brasilense* CBG-497, debido a que ésta es la única cepa de *Azospirillum* de la colección del Laboratorio Interacción Ambiente Microorganismo del Instituto Politécnico Nacional secuenciada y con anotación completa por lo cual consideramos que la búsqueda de otros genes como los involucrados en los procesos de biorremediación pudieran tener un impacto biotecnológico.

Esta se organizó en archivos individuales, para el cromosoma de aproximadamente 2.9 Mpb y 5 mega-plásmidos: P1 (1.5 Mpb), P2 (0.731 Mpb), P3 (0.488 Mpb) P4 (0.606 Mpb) P6 (148 Kb) en formato FASTA. Cada archivo se cargó de manera individual al servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), el cual realiza a través de una anotación rápida y automatizada de genomas provenientes de bacterias y arqueas basada en una tecnología de subsistemas; la asignación del posible rol funcional de cada gen ingresado al sistema de acuerdo con su propia matriz de datos.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de la producción de biosurfactantes

No obstante que los 17 biotipos probados presentaron crecimiento en el medio Agar base sangre a las 48 horas de incubación, ninguno de ellos presentó beta hemolisis, únicamente la cepa *Rodococcus ruber* utilizada como control positivo (Tabla 1). Por otro lado, del 100% de los biotipos de *Azospirillum* evaluados, el 47% formó los complejos tensioactivos aniónico y catiónico con el CTAB y el azul de metileno detectados por la presencia de halos de color azul oscuro más intenso, en particular los biotipos BV102 y AZ106. En cuanto a la respuesta de las cepas control positivas *Sphingobium yanoikuyae* y *Rhodococcus ruber* ambas presentaron crecimiento, pero solo en *R. ruber* formó el complejo tensioactivo (Tabla 1). En relación al cálculo del Índice de emulsificación, todos los biotipos de *Azospirillum brasilense* evaluados presentaron actividad emulsificante. A los cinco minutos de incubación se puede apreciar que los biotipos AZ106 y AZ190 presentaron un índice de emulsificación ($E=24$) en un intervalo de 50 a 59%, un valor mayor que el resto de los biotipos de *Azospirillum brasilense*. Asimismo, los resultados en las cepas *Sphingobium yanoikuyae* S72 y *Rhodococcus ruber* utilizadas como controles positivos fue de 64.83% y 44.50% respectivamente. En

la medición a los 10 minutos, la mayoría ya no presento actividad emulsificante o esta disminuyó drásticamente. En solo cinco biotipos (AZ141, BV174, AZ106, BV180 y BV190) se apreció el índice de emulsificación ($E=24$) en un rango de 10 a 22%. En la cepa *Sphingobium yanoikuyaе* utilizada como control positivo se observó un índice de emulsión del 64.83% hasta los 30 min ($E=24$) (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación de la síntesis de biosurfactantes por los biotipos de *Azospirillum brasiliense*.

CÓDIGO DEL BIOTIPO	PRUEBA DE HEMOLISIS	PRUEBA MEDIO S-W	INDICE DE EMULSIFICACIÓN (%)	
			5 min	10 min
AZ108	-	+	27.33	0.00
BV172	-	+	13.33	0.00
BV181	-	+	26.66	0.00
AZ141	-	+	43.33	22.50
BV174	-	+	38.33	22.50
AZ197	-	+	07.50	0.00
CBG 497	-	+	28.33	0.00
AZ101	-	+	25.00	0.00
AZ106	-	+	52.50	9.16
BV102	-	+	33.33	0.00
AZ105	-	+	0.00	0.00
BV180	-	+	45.83	11.66
AZ190	-	+	59.16	16.66
BV132	-	+	22.50	0.00
BV144	-	+	26.66	0.00
BV146	-	+	20.00	0.00
BV173	-	+	15.00	0.00
<i>R. ruber</i>	+	+	44.50	0.00
<i>S. yanoikuyaе</i>	-	-	64.83	64.83

Con base en los resultados obtenidos de estas pruebas, se seleccionaron los biotipos AZ141, BV174, BV180, BV190 y CBG 497, para la evaluación de éstos en la tolerancia a los contaminantes.

3.2. Evaluación *in vitro* de la capacidad de tolerar los principales contaminantes del petróleo

En los resultados de la evaluación de los cinco biotipos de *Azospirillum brasiliense* con cada uno de los contaminantes (xileno, tolueno, fenanreno y naftaleno) a una concentración de 80 µg/mL no se observó crecimiento bacteriano a las 216 horas de incubación a 30°C.

3.3. Análisis bioinformático del genoma de *Azospirillum brasiliense* CBG-497 en la plataforma de RAST

El análisis se realizó de manera individual, para el cromosoma y las secuencias de cada uno de los plásmidos. En cuanto a las características de los subsistemas el estudio se enfocó en la búsqueda de genes involucrados en el metabolismo de compuestos aromáticos. Fueron anotados que 19 secuencias codificantes incluidos tanto en el cromosoma como los plásmidos, a excepción de los plásmidos 2 y 6 los cuales no presentaron secuencias codificantes de participar en el metabolismo de compuestos aromáticos. Al menos 11 están asociadas con el metabolismo de los compuestos intermedios aromáticos centrales, mientras que 5 están involucrados en las vías catabólicas periféricas (las cuales convergen en las rutas centrales). Estos se distribuyeron en el genoma de la siguiente manera, para el cromosoma se asignaron seis, para el plásmido 1 seis, plásmido 3 dos, plásmido 4 seis mismas que se pueden observar en la Tabla 2. Los plásmidos 2 y 6 no se incluyen debido a que no contienen genes que codifican para el Metabolismo de compuestos aromáticos.

Tabla 2. Estructura de secuencias codificantes en el genoma de *Azospirillum brasiliense*

Genes relacionados a:	Número de CDS.			
	Cromosoma	Plásmido 1	Plásmido 3	Plásmido 4
Rutas periféricas para el catabolismo de compuestos aromáticos	2	1	0	2
Degrado anaeróbica de compuestos aromáticos	0	0	0	0
Metabolismo de compuestos intermedios aromáticos centrales	2	3	2	4
Metabolismo de compuestos aromáticos no subcategorizados	2	1	0	0
Total de Regiones que codifican para un gen determinado	6	6	2	6

En relación a la función de secuencias codificantes, se observó que están relacionadas con la degradación de quinato, benzoato, salicilato, gentisato y tolueno como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Genes y enzimas localizadas en el genoma de *Azospirillum brasiliense*.

Genes detectados	Acción
Quib (3-dehidroquinato dehidratasa) (EC 4.21.10)	Liasa
Ben E2 (Proteína de transporte de Benzoato)	Transportador
FAA (Fumarilacetoacetasa hidrolasa) (EC 3.7.1.2)	Hidrolasa
FHF (Fumarilacetoacetato hidrolasa) (EC 3.7.1.2)	Hidrolasa
PHBT (putativa 4-hidroxibenzoil-CoA tioesterasa)	Hidrolasa
CatD (Beta-ketoadipato enol-lactona hidrolasa) (EC 3.1.1.24)	Hidrolasa
MRML (mandelato racemasa)	Liasa
IQOa Isoquinolina 1-oxidoreductasa subunidad alfa (EC 1.3.99.16)	Oxidoreductasa
IQOa Isoquinolina 1-oxidoreductasa subunidad beta (EC 1.3.99.16)	Oxidoreductasa
SalA (Salicilato hidroxilasa) (EC 1.14.13.1)	Oxidoreductasa
TAD (toluenosulfonato zinc-independiente de alcohol dehidrogenasa)	Oxidoreductasa

Como se puede observar, las enzimas fueron en su mayoría del tipo hidrolasas y oxido-reductasas, mismas que son las principalmente reportadas en microorganismos que participan en estos procesos.

4. DISCUSIÓN

Las plantas y sus bacterias asociadas también juegan un papel importante en la degradación de los compuestos presentes en el suelo y el aire (Pattanayak & Dhal., 2014). Los organismos individuales son capaces de metabolizar una gama limitada de sustratos de hidrocarburos (Marin *et al.*, 1996). Sin embargo, es importante realizar estudios de cada uno de ellos para obtener información acerca de su comportamiento y características cuando son confrontados a compuestos xenobióticos.

La liberación de biosurfactantes es una de las estrategias utilizadas por los microorganismos para influir en la absorción de hidrocarburos y compuestos hidrofóbicos en general (Johnsen *et al.* 2005, Chong & Li, 2017); debido a que la estructura de los biosurfactantes permite solubilizar los hidrocarburos y con esto hacerlos disponibles para la degradación (Nievas *et al.*, 2008, Hmidet *et al.*, 2017). A pesar de obtener crecimiento de cada una de los 17 biotipos de *Azospirillum brasiliense* en medio base sangre, ninguna de ellas presentó beta hemolis. Existen estudios en los cuales se ha asociado la actividad hemolítica y la producción de biosurfactantes (Plaza *et al.*, 2006, Lamilla *et al.*, 2018). Sin embargo, ésta no es una prueba contundente debido a que, otros autores como Pacwa-Płociniczak *et al.* (2014) reportaron que una cepa de *Pseudomonas* sp la cual resultó positiva para la actividad hemolítica fue insuficiente para confirmar la producción de biosurfactantes, debido a que esta cepa posee además de

biotensioactivos, β - hemolisinas, resultan positivas en la actividad hemolítica, por lo cual se requiere de la aplicación de pruebas adicionales. En la prueba con el medio Siegmund-Wagner, el 100% de los biotipos de *Azospirillum brasiliense* evaluados crecieron, pero solo ocho de ellos resultaron positivos lo cual fue corroborado de manera visible por la presencia de un halo color oscuro debido a la interacción en la que los tensioactivos aniónicos forman un par iónico insoluble con el tensioactivo catiónico del CTAB y el colorante azul de metileno (Siegmun & Wagner, 1991). Esta técnica surgió como alternativa al uso de agar sangre para la detección de biosurfactantes, ya que cuenta con varias ventajas, como por ejemplo la no represión catabólica de la producción de biosurfactantes, la no ocurrencia de falsos positivos debido a presencia de hemolisinas, o la mayor estabilidad del agar (Tabuchi *et al.*, 2015). Para el caso de los resultados de la evaluación del índice de emulsificación se observó que los 17 biotipos de *Azospirillum brasiliense* presentaron diferencias en la actividad emulsificante de acuerdo al tiempo de evaluación. A los cinco minutos se observó un Índice de Emulsificación (E24) de 45 a 59% en los biotipos sin embargo en la medición a los 10 minutos podemos observar que la mayoría ya no presento actividad emulsificante o esta disminuyó drásticamente del (E24) de 10 al 20%. Estos resultados varían dependiendo del microorganismo en estudio, Illori *et al.* (2005) evaluaron una cepa de *Aeromonas* spp. aislada de aguas tropicales. Los biosurfactantes producidos por el organismo emulsificaron un rango de hidrocarburos obteniéndose un (E24) del 65% al utilizar diésel como fuente de carbono y un (E24) de 22% al utilizar hexano. Obayori *et al.* (2009) estudiaron el potencial de producción de biosurfactantes en *Pseudomonas* sp. cepa LP1 y observaron que el valor del Índice de Emulsificación (E24) fue de 80.33 ± 1.20 al utilizar aceite como fuente de carbono después de ocho días de incubación.

En relación a los resultados que muestran que los 17 biotipos fueron sensibles a xileno, naftaleno, fenantreno, tolueno, probados en este estudio. Existen pocos trabajos para comparar los resultados obtenidos con *Azospirillum brasiliense*. Barkovsky *et al.* (1995) evaluaron la capacidad de degradación de fenol y benzoato en 31 cepas de *Azospirillum brasiliense* y *Azospirillum lipoferum* aisladas de la rizosfera y rizoplano de diferentes plantas. Los resultados mostraron que solo nueve cepas degradaron benzoato y tres degradaron fenol observándose claramente un grado de especificidad entre las cepas de *Azospirillum* evaluadas. Muratova *et al.* (2005) evaluaron la tolerancia de 33 cepas de *Azospirillum*, de diferentes especies incluyendo *Azospirillum brasiliense* en medios de cultivo a los cuales se les adicionó petróleo crudo ligero al 1% como fuente de carbono. Ellos observaron que dos cepas *A. lipoferum* SR42 y *A. brasiliense* SR80 degradaron petróleo, con un porcentaje de degradación del 57.5 y 56.5% respectivamente después de 14 días de incubación.

En los resultados en cuanto a la búsqueda de genes relacionados con la degradación de compuestos aromáticos, las enzimas oxidorreductasas e hidrolasas fueron las más representativas. Chandrakant & Shwetha (2011), Kadri *et al.* (2017) reportaron que la detoxificación de compuestos orgánicos tóxicos utilizado por bacterias y hongos es a través de oxidorreductasas los cuales

participan activamente en el proceso de biorremediación. En este trabajo se reportaron genes y enzimas como 3-Dehidroquinato deshidratasa, fumarilacetoadecetasa hidrolasa, beta-ketoadipato enol-lactona hidrolasa, Salicilato hidroxilasa y una proteína de transporte de benzoato lo cual concuerda con lo reportado por Wisniewski-Dyé *et al.* (2012). En dicha investigación se realizaron análisis de genómica comparativa analizando el genoma de las cepas *Azospirillum brasiliense* Sp245, *Azospirillum lipoferum* 4B, *Azospirillum* sp. B510 y *Azospirillum brasiliense* CBG 497. Estos autores reportaron que la degradación de un amplio espectro de compuestos aromáticos y xenobióticos se basa en dos intermediarios centrales: catecol y protocatecuato. Las cepas *A. lipoferum* 4B y *Azospirillum* poseen enzimas que permiten la conversión de benzoato y 4-hidroxibenzoato en protocatecuato. Además, *Azospirillum* sp. B510 puede convertir benzoato en catecol, para el caso de la cepa CBG 497 se encontró el gen Ben E2 que codifica para una proteína de transporte de benzoato. Las cepas de *Azospirillum brasiliense* parecen ser las menos versátiles con solo una vía de degradación de protocatecuato, encontrándose en la cepa CBG 497 el gen Quib que codifica para la enzima 3- dehidroquinato deshidratasa involucrada en esa vía.

Los biotipos de *Azospirillum brasiliense* evaluados presentaron actividad emulsificante, sin embargo, su crecimiento fue inhibido en los medios de cultivo inoculados con los diferentes hidrocarburos. La cepa CBG497 aislada de la rizosfera de gramíneas de esta región, tiene genes relacionados con la degradación de compuestos aromáticos en su genoma, lo cual le podría conferir su adaptación en suelos contaminados con hidrocarburos. Es importante mencionar que éste es el primer estudio que involucra biotipos del género *Azospirillum* en cuanto a su evaluación del potencial de tolerancia a hidrocarburos, ya que los estudios han sido realizados principalmente en el estudio en sus características como bacterias asociativas que estimulan el crecimiento y el desarrollo de su planta hospedera.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Alberto Mendoza Herrera (*in memoriam*), quien fundó la línea de investigación sobre *Azospirillum brasiliense* en el Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M. & Naidu R. 2015. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176:670-699.
- Barkovskii A. L., Korshunova V. E. & Pozdnyacova L. I. 1995. Catabolism of phenol and benzoate by *Azospirillum* strains *Applied Soil Ecology* 2:17-24
- Carrillo PG., Mardaraz C., Pitta-Alvarez. & SJ Giulietti AM. 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 12:82–84.
- Chandrakant S. K. & Shwetha S. R. 2011. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*. Article ID 805187, 11 pages.
- Chong H & Li Q. 2017. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*. 16:137.
- Covarrubias SA., LE de-Bashan., M Moreno. & Y Bashan. 2012. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Environmental Microbiology* 93, 2669-2680.
- Eckford R., Fred D., Cook D., Aislabie J. & J Foght. 2002. Free-Living Heterotrophic Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Fuel-Contaminated Antarctic Soils. *Applied and Environmental Microbiology* p. 5181–5185
- Fulekar M. 2017. Microbial degradation of petrochemical waste-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresources and Bioprocessing*. 4:28.
- García J.E., Maroniche G., Creus C., Suárez-Rodríguez R., Ramírez-Trujillo J.A., & Groppa M.D. 2017. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research* 202. 21–29
- González-Paredes Y., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Almaraz J.J., Martínez-Romero E., Cruz-Sánchez J.S., Mendoza-López M. R. & Ormeno-Orrillo E. 2013. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Applied Soil Ecology*. 63:105-111.
- Gouma S., Fragoeiro S., Bastos A.C. & Magan N. 2014. Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. *Microbial Biodegradation and Bioremediation* 301-323.

Hmidet N., Ayed H., Jacques P. & Nasri M. 2017. Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. Volume 2017, ID 5893123

Höhener P. & Ponsin V. 2013. In situ vadose zone bioremediation. Environmental biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 27: 1-7.

Ilori M.O., Amobi C.J. & Odoch A.C. 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp., isolated from a tropical environment. Chemosphere 61:985–992.

Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. Jan;133(1):71-84.

Kadri T., Rouissi T., Kaur-Brar S., Cledon M., Sarma S. & Verma M. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes. A review. Journal of Environmental Sciences (China). Jan;51:52-74. doi: 10.1016/j.jes.2016.08.023. E pub 2016 Oct 3.

Kaushal M. & Wani S.P. 2016. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. Annals of Microbiology 66:35–42.

Lamilla C., Braga D., Castro R., Guimarães C. V. A., de Castilho L., Freire D. & Barrientos L. 2018. *Streptomyces luridus* So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. PLoS ONE 13(4): e0196054.

Marin M.A., Pedrogosa A. & Laborda F. 1996. Emulsifier production and microscopical study of emulsions and biofilms from by the hydrocarbon utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*. MM5. Applied Microbiology and Biotechnology 44:660–667. doi:10.1007/BF00172500.

Maldonado-Chávez E., Rivera-Cruz M.C., Izquierdo-Reyes F. & Palma-López D.J. 2010. Effects of rhizosphere, microorganisms and fertilization on bioremediation and phytoremediation of soils with new and weathered crude oil. Publicaciones/ciencia 26(2):121-136.

Miranda-Martínez M., Delgadillo-Martínez R. J., Alarcón A. & Ferrera-Cerrato R. 2007. Degradación de fenanreno por microorganismos en la rizósfera del pasto alemán Terra. Latinoamericana [en linea]

Muratova A.Y., Turkovskaya O. V., Antonyuk L. P., Makarov O. E., Pozdnyakova L. I. & Ignatov V. V. 2005. Oil-Oxidizing Potential of Associative Rhizobacteria of the Genus *Azospirillum* Microbiology, Vol. 74(2) pp. 210–215. Translated from

Mikrobiologiya, Vol. 74, No. 2, 2005, pp. 248–254. Original Russian Text Copyright © 2005 by Muratova, Turkovskaya, Antonyuk, Makarov, Pozdnyakova, Ignatov

Nievas M., Commendatore M., Estevas J. & Bucalá V. 2008. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. Journal of Hazardous Materials. 154(1-3): 96–104.

Obayori O.S., Ilori M.O., Adebusoye S.A., Oyetibo G.O., Omotayo A.E. & Amund O.O. 2009. Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25:1615–1623. DOI 10.1007/s11274-009-0053-z

Pacwa-Płociniczak M., Plaza G. A., Poliwoda A. & Piotrowska-Seget Z. 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. Environmental Science and Pollution Research. 21:9385–9395

Pattanayak B. & Dhal N. K. 2014. Biotechnological potential of plant microbe interaction with enhanced phytoremediation. Journal of Environmental Research and Development Vol. 8 No. 3A, January-March.

Pérez-Castañeda L.M., Cruz-Hernández M.A. & Mendoza-Herrera A. 2011. Variabilidad genética de aislamientos no-típicos de *Azospirillum brasiliense* por análisis PCR-RFLP del ADN 16S ribosomal. PHYTON ISSN 0031 9457 80: 27-34

Plaza G., Zjawiony I. & Banat I. 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. Journal of Petroleum Science and Engineering. 50: 71–77.

Rodríguez-Salazar J., Suárez R., Caballero-Mellado J., Iturriaga G. 2009. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasiliense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. FEMS Microbiology Letters. 296(1) 52–59.

Siegmund I. & Wagner F. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotechnology Techniques. 5:265–268.

Steenhoudt O. & Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free living bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews 24:487–506.

Tabuchi T., Martínez D., Hospital M., Merino F., Gutiérrez S. 2015. Optimization and modification of the method for detection of rhamnolipids. Revista Peruana de Biología. Vol.22 no.2 Lima ago.

Wisniewski-Dyé F., Lozano L., Acosta-Cruz E., Borland S., Drogue B., Prigent-Combaret C., Rouy Z., Barbe V., Mendoza Herrera A., González V. & Mavingui P. 2012. Genome Sequence of *Azospirillum brasiliense* CBG497 and Comparative Analyses of *Azospirillum* Core and Accessory Genomes provide Insight into Niche Adaptation. *Genes* 2012(3): 576-602.

Wolicka D., Suszek A. & Borkowski A. 2009. Application of aerobic microorganisms in bioremediation *in situ* of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*. 100(13) 3221-3227.

Zhao Ma., Liu L., Dick R., Li H., Shen D., Gao Y., Waigi M. & Ling W. 2018. Rhamnolipid influences biosorption and biodegradation of phenanthrene by phenanthrene-degrading strain *Pseudomonas* sp. Ph6. *Environmental Pollution*. 240: 359-367.