

Revista Electrónica Nova Scientia

Degradación de Fenantreno por bacterias del género *Burkholderia* y *Rhizobium* aisladas de nódulos de mimosas

Degradation of Phenatrene by bacteria of the genus *Burkholderia* and *Rhizobium* isolated from nodules of mimosas

Arnoldo Wong-Villarreal¹, Erick Santiago-Mendez¹, Emanuel Hernández Núñez², Gustavo Yáñez-Ocampo³, Germán Giacomán Vallejos⁴, Avel González Sánchez⁴, Sandra I. Ramírez González⁵, Saúl Espinosa-Zaragoza⁶ y Orlando López- Báez⁵

¹División Agroalimentaria, Universidad Tecnológica de la Selva, Ocosingo, Chiapas

²Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mérida, Yucatán

³Laboratorio de Edafología y Ambiente, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca

⁴Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán

⁵ Laboratorio de Agrotecnologías, Universidad Autónoma de Chiapas

⁶Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas, Huehuetán.

México

Arnoldo Wong Villarreal. E-mail: wova79@hotmail.com

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar y evaluar la capacidad de degradación de microorganismos aislados de nódulos de mimosas, que puedan ser utilizados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

Método. Se realizó el aislamiento de 122 cepas bacterianas de nódulos de mimosas; fueron crecidas en el medio de cultivo Maconkey para descartar enterobacterias. Las cepas bacterianas que dieron resultado negativo a esta prueba, fueron inoculadas en el medio de cultivo que contenía como única fuente de carbono fenantreno; tres aislados tuvieron la capacidad de crecer en este medio. Las tres cepas fueron identificadas por secuencia del gen 16s ribosomal, se evaluó su capacidad de crecimiento en presencia de fenantreno mediante curvas de crecimiento microbiano; la capacidad para degradar fenantreno de las tres cepas fue cuantificada por cromatografía de gases acoplado a masas.

Resultados. Las secuencias obtenidas del gen 16s ribosomal tienen relación genética con las especies de *Burkholderia phenoliruptrix*, *Burkholderia phymatum* y *Rhizobium paknamense*. El crecimiento microbiano de las tres cepas, suministradas con fenantreno, tuvieron un comportamiento similar al control, el cual contenía succinato como fuente de carbono. La cepa de *Burkholderia* sp. BB26 degradó 78.5 %, *Burkholderia* sp. BB24 68.5% y *Rhizobium* sp. BY8 99%.

Discusión. Los resultados de degradación de fenantreno por las cepas de *Burkholderia* sp. BB26, *Burkholderia* sp. BB24 y *Rhizobium* sp. BY8 sugieren que las tres cepas tienen potencial para utilizarse en procesos de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

Palabras Clave: *Burkholderia*; *Rhizobium*; mimosas; fenantreno

Recepción: 23-05-2017

Aceptación: 11-09-2017

Abstract

The present work aimed to identify and evaluate degradation capacity of microorganisms isolated from mimosa nodules, which can be used in bioremediation processes of soils contaminated with phenanthrene.

Method. Isolation of 122 bacterial strains of mimosa nodules was grown in the Maconkey culture medium to discard enterobacteria; the bacterial strains that resulted negative to this test, were inoculated in the culture medium containing only phenanthrene source carbon. Three isolates had the capacity to grow in this medium. The three strains were identified by sequence of the 16s ribosomal gene, their capacity to grow in the presence of phenanthrene was assessed by microbial growth curves; the ability to degrade phenanthrene of the three strains was quantified by mass-coupled gas chromatography.

Results. The sequences obtained from the 16s ribosomal gene are genetically related to the strains of *Burkholderia phenoliruptrix*, *Burkholderia phymatum* and *Rhizobium paknamense*. The microbial growth of the three strains, supplied with phenanthrene, had a similar behavior to the control, which contained succinate as a carbon source. The strain of *Burkholderia* sp. BB26 degraded 78.5%, *Burkholderia* sp. BB24 68.5% and *Rhizobium* sp. BY8 99%.

Discussion. The results of phenanthrene degradation by *Burkholderia* sp. BB26, *Burkholderia* sp. BB24 and *Rhizobium* sp. BY8 strains suggest that the three strains have potential to be used in bioremediation processes of soils contaminated with phenanthrene.

Keywords: *Burkholderia*; *Rhizobium*; mimosas; phenanthrene

Introducción

La contaminación con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) causa la inhibición de microorganismos del suelo (Eom *et al.* 2007). Sin embargo, algunos grupos de microorganismos pueden adaptarse y crecer en presencia de estos compuestos orgánicos (Peixoto *et al.* 2011). Por ejemplo, bacterias aeróbicas pueden tolerar los HAP (Si-Zhong *et al.* 2009), y son comunes en sitios contaminados por plaguicidas y metales pesados. Las bacterias resistentes pueden utilizar los HAPs como fuente de carbono y energía para su crecimiento y reproducción; además, liberan enzimas como dioxygenasas, peroxidasas y catalasas, para que oxiden a los HAP y consecuentemente lo transformen o degraden a compuestos menos tóxicos (Harvey *et al.* 2002). La biodegradación de HAP se ha estudiado principalmente en bacterias vivas libres; aunque hay pocos casos de biodegradación estudiados en bacterias simbióticas. En este sentido, las bacterias simbióticas pertenecientes al género *Rhizobium* son bien conocidas por establecer una simbiosis mutualista con las leguminosas y por su contribución a la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Oldroyd y Downie, 2008). Barret y Parker (2005), identificaron bacterias del género *Burkholderia* como simbiosiontes de nódulos en *Mimosa pigra*, *Mimosa casta*, *Mimosa pudica* y *Abarema macradenia* en la isla de Barro Colorado, Panamá. También estudios de plantas de *Mimosa* spp. en América Central y del Sur, reportaron que forman simbiosis con *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Rhizobium* en sus ambientes nativos (Barrett y Parker, 2006), pero la mayoría de las especies en Brasil, que es el centro más grande de la diversidad *Mimosa*, tienen una preferencia abrumadora por *Burkholderia* (Bontemps *et al.* 2010, dos Reis *et al.* 2010; Simon *et al.* 2011). La ventaja de utilizar bacterias simbióticas en los procesos de biorremediación de HAP está relacionada con su capacidad para fijar nitrógeno que es limitante durante la biorremediación, ya que la deposición de hidrocarburos de petróleo aumenta significativamente la acumulación de carbono orgánico en el suelo y genera una relación C/N muy alta (López-Martínez *et al.* 2005; Radwan *et al.* 2007). *Rhizobium tropici* CIAT 899 ha sido reportado como tolerante a los metales pesados y antibióticos como cloranfenicol, espectinomina, carbenicilina y estreptomina (Martínez-Romero *et al.* 1991). Otros miembros del género *Rhizobium* o *Mesorhizobium* son capaces de tolerar y degradar sustancias tóxicas tales como dibenzotiofeno, 2,4-dinitrotolueno (Dutta *et al.* 2003), y algunos HAP como fenantreno y acenaftileno (Poonthiripun *et al.* 2006). *Rhizobium tropici* CIAT 899 mostró tolerancia en crecimiento a 40 g/mL de fenantreno degradando el 50%, y benzopireno a 60 g/mL, degradando 45% a las 120 h

(González *et al.* 2013). El objetivo de este estudio fue aislar bacterias de nódulos de mimosas y evaluar su capacidad degradadora de fenantreno en medios de cultivo líquidos.

Métodos

Aislamiento

Se colectaron plantas de mimosas en Municipios del estado de Chiapas, México; posteriormente se les extrajeron los nódulos de la raíz (Tabla 1). Los nódulos colectados fueron lavados y sumergidos en etanol al 70 % durante 5 minutos, posteriormente desinfectados con hipoclorito de sodio al 25 % durante 15 minutos, el exceso de hipoclorito fue eliminado con lavados de agua destilada estéril. Finalmente los nódulos desinfectados fueron macerados y resuspendiendo en una solución de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 10 mM (Wong y Caballero, 2010). Se inocularon 100 μL de la suspensión en el medio de cultivo de Extracto de Levadura- Manitol (YMA) las cajas inoculadas fueron incubadas a 29 °C durante 2 días, posteriormente fueron seleccionadas colonias que presentaron diferente morfología.

Las cepas bacterianas aisladas fueron seleccionadas con base al crecimiento en los medios de cultivo diferenciales de agar MacConkey y agar hierro de Kligler para descartar enterobacterias.

Tabla 1. Plantas de Leguminosas colectadas en diferentes localidades del estado de Chiapas, México.

Localidad	Plantas de leguminosas
Mapastepec	<i>Mimosa pigra</i> , <i>Mimosa púdica</i> , <i>Mimosa acustistipula</i> , <i>Mimosa albida</i> , <i>Mimosa diplotricha</i>
Pijijiapan	<i>Mimosa pigra</i> , <i>Mimosa púdica</i> , <i>Mimosa flocculosa</i> , <i>Mimosa albida</i>
Huixtán	<i>Mimosa pigra</i>
Ocosingo	<i>Mimosa pigra</i> , <i>Mimosa paraibana</i>

Georreferencia: Mapastepec, 15°26'30"N, 92°53'30"O; Pijijiapan, 15°41'12"N, 93°12'33"O; Huixtán, 16°43' -'' N, 92°27' -'' O; Ocosingo, 16°54'26"N, 92°05'46"O.

Secuenciación del gen 16S rARN

Para realizar la identificación de las cepas, se realizó la extracción del ADN de los aislados seleccionados con el kit ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™. Posteriormente se amplificó por PCR el gen 16S rARN, utilizando los oligonucleótidos fD1 y rD1 (Weisburg *et al.* 1991), el producto de amplificación obtenido de 1.4 Kb fue purificado de gel con el kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias del gen 16S rARN fueron alineadas con el programa CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994). Los árboles filogenéticos fueron construidos con el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), empleando 1400 nucleótidos del gen 16S ribosomal de acuerdo con la matriz de distancia de Jukes y Cantor (1969), utilizando el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.* 2013).

Cinética de crecimiento microbiano

Las cepas BB24, BB26 y BY8 fueron crecidas en medio de cultivo PY (peptona extracto de levadura) durante 24 h a 29°C con agitación a 200 rpm. Posteriormente, los cultivos bacterianos fueron ajustados a una densidad óptica de 0.2 a 600 nm, e inoculados en matraces que contenían 200 mL del medio de cultivo Bushnell Haas Broth (BHB), composición (g/L): 0.2 MgSO₄·7H₂O, 0.02 CaCl₂·2H₂O, 1 KH₂PO₄, 1 K₂HPO₄, 1 NH₄NO₃, 0.05 FeCl₃, y Tween-80, como fuente de carbono fenantreno 500 ppm y succinato de sodio (5g/L) como control (sigma-aldrich). Los cultivos fueron crecidos durante 168 h a 29°C con agitación a 200 rpm, el crecimiento bacteriano durante el proceso de degradación del compuesto aromático se determinó mediante diluciones seriadas de los cultivos para cuantificar el crecimiento microbiano por cuenta viable, 100 µL de las diluciones fueron inoculadas en cajas Petri con medio de cultivo PY durante 48 h e incubados a 29°C. Las mediciones se realizaron a las 0, 24, 48, 72, 96 y 168 h del periodo de incubación. Los resultados fueron analizados por comparación de medias con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de P≤0.05, utilizando el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.3).

Extracción de HAPs de la fase líquida

Se empleó la técnica de extracción en fase sólida (SPE) en su modalidad de cartuchos con C18. Las columnas de extracción se activaron previamente con 5 mL de metanol, 5 mL de hexano y 5 mL de agua mili-Q. Se pasaron 50 mL del medio de cultivo a través de los tubos de SPE a una presión de 25 psi y con un flujo de 1-2 mL/min. Después, se adicionaron 5 mL de agua mili-Q. La elución de los HAPs se realizó con 10 mL de hexano. Se concentró el extracto hasta sequedad bajo un flujo de argón de alta pureza 99.997% (INFRA) y se volvió a suspender el extracto con 1 mL de acetonitrilo. El extracto concentrado se almacenó en un vial de borosilicato ámbar de 2 mL con tapón de rosca y septa de PTFE, se le adicionó 50 µg/L de *p*-Terfenilo (sigma-aldrich) como estándar interno y fue refrigerado a 4°C hasta su análisis cromatográfico.

Cuantificación por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para la determinación de fenantreno se utilizó un cromatógrafo de gases (Thermo Trace GC Ultra) acoplado a un espectrómetro de masas con una trampa de iones (ITQ 900) (Thermo Fisher Scientific Inc, Austin, TX USA). Las condiciones de operación del GC-MS fueron las siguientes: Se utilizó 2 µL de muestra por análisis. La inyección fue en modo *splitless* con un automuestreador (TriPlus Autosampler). La temperatura del inyector fue de 250 °C y de la línea de transferencia fue de 270 °C. La temperatura de la fuente de iones fue de 200 °C. Los componentes fueron separados en una columna capilar modelo TR-5MS 5% fenilmetilsiloxano (30 m longitud x 0.25 mm diámetro interno) con 0.25 µm de espesor de la fase estacionaria. La rampa de temperatura del horno fue una temperatura inicial de 70°C mantenida durante 1 min, seguido de un gradiente de 15°C/min hasta alcanzar 180°C mantenidos durante 1 min, posteriormente incrementos de temperatura de 5°C/min hasta 270 °C mantenidos 15 min (tiempo de corrida: 42 min). El gas portador fue helio de ultra alta pureza (INFRA) (99.9999%). El detector de masas operó en modo de monitoreo de ion selectivo (SIM).

Resultados

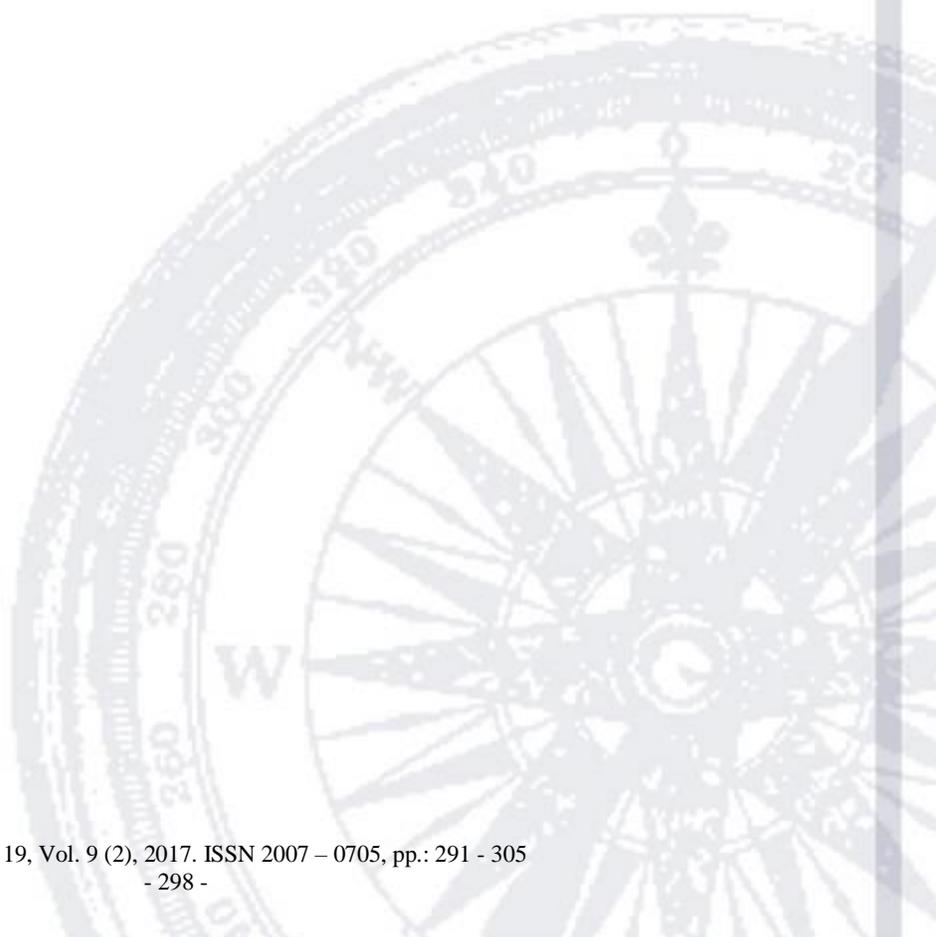
Aislamiento

De los nódulos de mimosas colectadas en el estado de Chiapas, se aislaron 122 cepas bacterianas en el medio de cultivo YMA, posteriormente fueron crecidas en el medio de cultivo MacConkey; se identificaron 80 cepas que pertenecen a enterobacterias. Estos resultados fueron confirmados

con el medio de cultivo agar hierro de Kligler, descartándolas del grupo de cepas aisladas. Las 42 que no crecieron en el medio de cultivo MacConkey fueron crecidas en medio de cultivo Bushnell Haas Broth (BHB) que contenía como única fuente de carbono fenantreno a 500 ppm, solamente las cepas BB24, BB26 y BY8 tuvieron la capacidad de crecer en presencia de este compuesto.

Identificación

Las secuencias obtenidas de las tres cepas fueron comparadas con la base de datos de nucleótidos del GenBank. Dos cepas presentaron relación genética con especies del género *Burkholderia*. La secuencia de la cepa BB24 presentó el 99% de identidad con *Burkholderia phymatum*, la cepa BB26 presentó 99 % identidad con *Burkholderia phenoliruptrix* y la secuencia de la cepa BY8 99 % identidad con *Rhizobium paknamense*. La relación genética de las cepas aisladas con las especies de *Burkholderia* y *Rhizobium* reportadas se puede observar en el árbol filogenético construido con el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), basado en 1400 nucleótidos de las secuencias del gen 16S ribosomal de acuerdo a la matriz de distancia Jukes y Cantor 1969 (Figura 1).



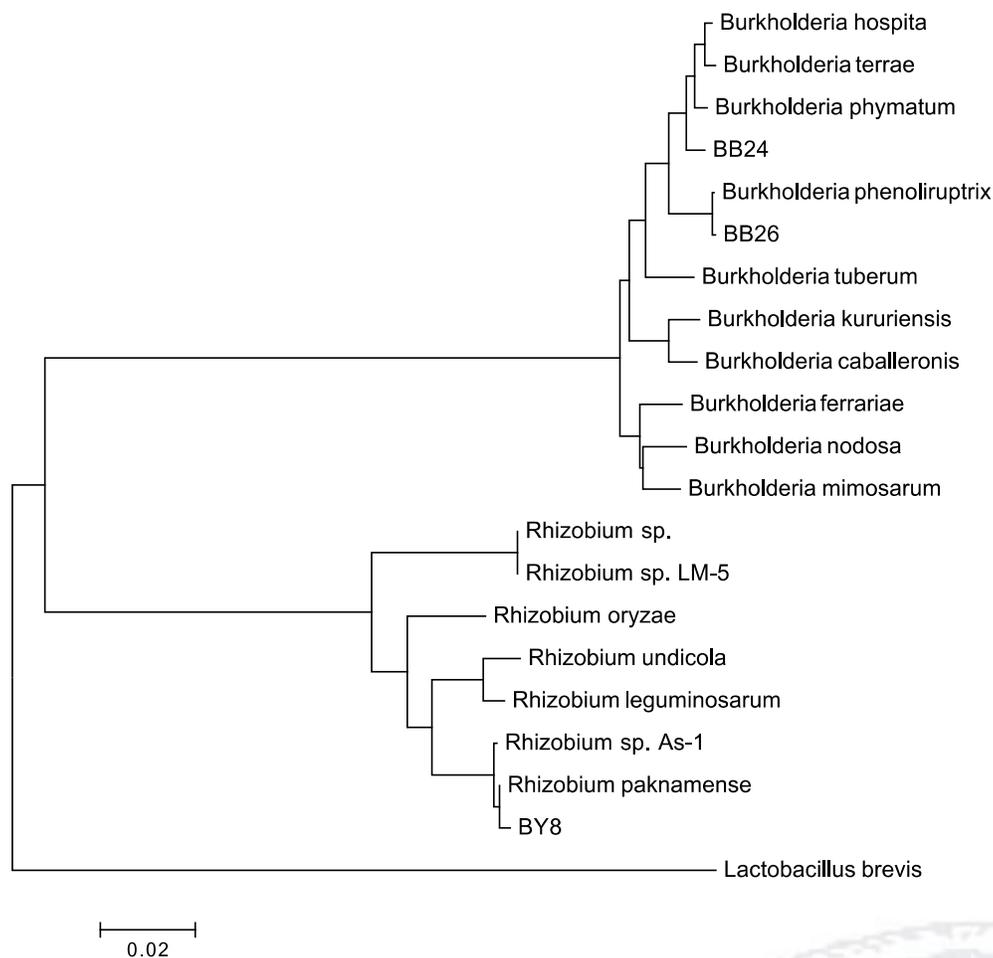


Figura 1. Árbol filogenético basado en secuencias de genes 16S rARN, que muestra la relación de las cepas aisladas con especies del género *Burkholderia* y *Rhizobium*. La barra representa 2 nucleótidos sustituidos por cada 100 nucleótidos.

Cinética de crecimiento microbiano

Las cepas de *Burkholderia* sp. BB26, *Burkholderia* sp. BB24 y *Rhizobium* sp. BY8 en presencia de fenantreno 500 ppm como fuente de carbono, tuvieron un comportamiento de crecimiento similar al tratamiento control, el cual utilizó como fuente de carbono succinato de sodio. Los resultados obtenidos fueron analizados por comparación de medias, y no se encontró diferencia significativa en los tratamientos (Figura 2, A, B, C).

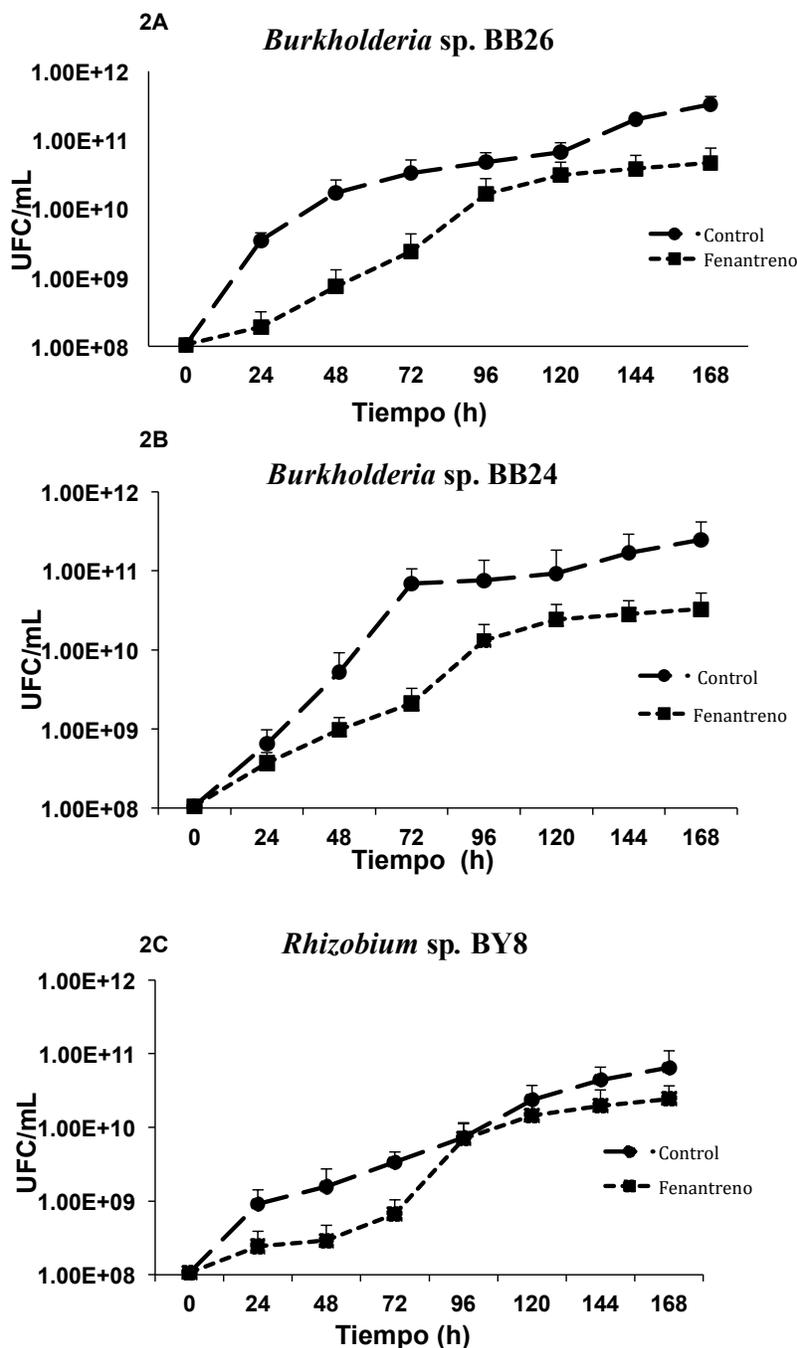


Figura 2. Curvas de crecimiento microbiano de las cepas de *Burkholderia* y *Rhizobium* en medio BHB con fenantreno 500 ppm; A) *Burkholderia* sp. BB26; B) *Burkholderia* sp. BB24; C) *Rhizobium* sp. BY8.

Cuantificación de compuestos aromáticos por Cromatografía de gases

Las cepas de *Burkholderia* sp. BB26, *Burkholderia* sp. BB24 y *Rhizobium* sp. BY8, crecieron en presencia de fenantreno (500 ppm). En la Figura 3 se reporta el porcentaje de degradación de

fenantreno realizado por las tres cepas bacterianas, se observa que durante 168 horas de la cinética, el contaminante va siendo removido del medio de cultivo. A las 168 h de incubación, la cepa *Rhizobium* sp. BY8 fue capaz de degradarlo en 99% (Figura 3C), *Burkholderia* sp. BB26 78.5 % (Figura 3B) y *Burkholderia* sp. BB24 68.5% de fenantreno a una concentración de 500 ppm (Figura 3A).

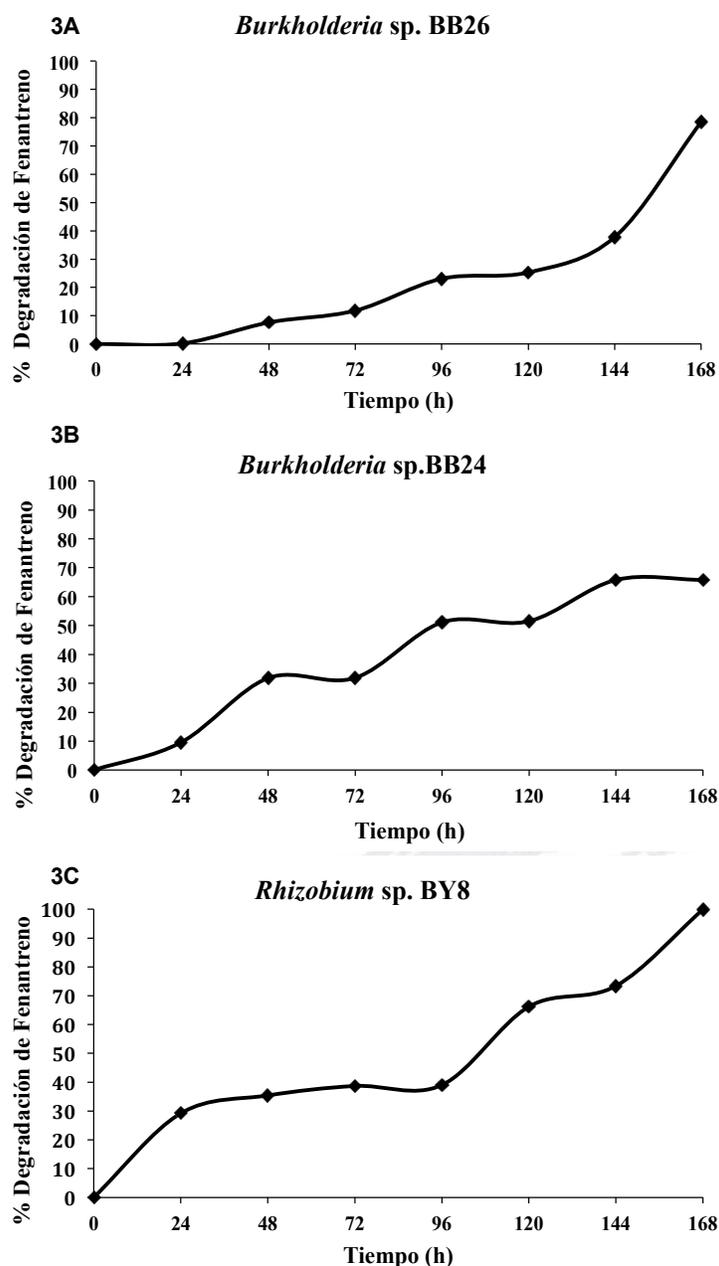


Figura 3. Porcentaje de degradación de las cepas de *Burkholderia* y *Rhizobium* en presencia de fenantreno 500 ppm, cuantificadas por cromatografía de gases acoplado a masas A) *Burkholderia* sp. BB26; B) *Burkholderia* sp. BB24; C) *Rhizobium* sp. BY8.

Discusión o Conclusiones

Las tres cepas aisladas de los nódulos de mimosas que tuvieron la capacidad de crecer en presencia de fenantreno están relacionadas genéticamente por análisis de secuencia del gen 16S ribosomal con *Burkholderia phenoliruptrix*, *Burkholderia phymatum* y *Rhizobium paknamense*. La cepa de *Burkholderia* sp. BB26 tuvo el mayor crecimiento a las 120 h en presencia de fenantreno. El comportamiento del crecimiento microbiano en presencia de este hidrocarburo fue muy similar al control, el cual contenía como fuente de carbono succinato, que es una fuente de carbono que liberan las plantas en los exudados radicales y que es fácilmente metabolizable por las bacterias en la rizosfera. El mismo comportamiento de crecimiento lo presentaron las cepas de *Burkholderia* sp. BB24 y *Rhizobium* sp. BY8 en presencia de fenantreno. Durante el crecimiento bacteriano se evaluó la capacidad de degradar fenantreno de las cepas; *Burkholderia* sp. BB26 degradó el 78.5% de fenantreno a las 120 h de crecimiento. Sin embargo es el primer reporte de una cepa relacionada genéticamente a *Burkholderia phenoliruptrix* como degradadora de fenantreno, debido a que esta especie ha sido reportada como degradadora de xenobióticos recalcitrantes (Coenye *et al.* 2004). Mientras que *Burkholderia phymatum* ha sido reportada como osmotolerante, pero no con la capacidad de degradar fenantreno, en este trabajo la cepa *Burkholderia* sp. BB24 relacionada genéticamente a esta especie degradó 65% a las 120 h de crecimiento. Algunas especies del género *Burkholderia* como *Burkholderia cepacia* G4, han sido reportadas como degradadoras de tricloroetileno (Kim *et al.* 2014), *Burkholderia unamae*, *Burkholderia kururiensis* y *Burkholderia xenovorans* son especies reportadas con capacidad de crecer en presencia de benceno, fenol, tolueno y bifenilos (Caballero *et al.* 2007). Especies del género *Rhizobium* han sido reportadas como degradadoras de compuestos xenobióticos, entre ellas *Rhizobium tropici* CIAD 899, que tiene la capacidad de degradar fenantreno el 50% y 45% de benzopireno a las 120 h; *Rhizobium leguminosarum* fue reportada como degradadora de tolueno, mientras que *Rhizobium paknamense* no ha sido reportado como degradadora de xenobióticos, es el primer reporte de una cepa relacionada genéticamente con esta especie como degradadora de fenantreno. Durante el crecimiento de esta cepa, se encontró que degradada el 99% de fenantreno 500 ppm a las 168 h de crecimiento, esta capacidad de *Rhizobium* sp. BY8 para degradar fenantreno es comparable a bacterias del género *Pseudomonas* que degradan el 98% después de diez días de incubación, mientras que *Stenotrophomonas* y *Bacillus thuringiensis* FQ1 degradan el 95% en suelo después de tres meses de incubación, *Alcaligenes*

faecalis y *Brevundimonas* degradan del 90-95% a las 72 h, estas bacterias utilizan este compuesto como fuente de carbono y energía (Xia *et al.* 2010; González *et al.* 2013; Galazka y Galazka, 2015; Jiang *et al.* 2015). Los resultados de degradación de fenantreno por las cepas de *Burkholderia* sp. BB26 *Burkholderia* sp. BB24 y *Rhizobium* sp. BY8 sugieren que las tres cepas tienen potencial para utilizarse en procesos de biorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Secretaría de Educación Pública (SEP), por el financiamiento para el desarrollo del proyecto Ciencia Básica número 179540.

Referencias

- Barrett, C.F., Parker, M.A. (2005). Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. *Systematic and Applied Microbiology*. 28, 57–65.
- Barrett C.F., Parker, M.A. (2006) Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Applied Environmental Microbiology*.72, 1198–1206.
- Caballero, M.J., Onofre, L.J., Estrada, S.P., Martínez, A.L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest in agriculture and bioremediation. *Applied Environmental Microbiology*. 73, 5308-19.
- Coenye, T., Henry, D., Speert, D. P., Vandamme, P. (2004). *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Systematic and Applied Microbiology*. 27(6), 623-627.
- dos Reis Junior, F.B., Simon, M.F., Gross, E. (2010). Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist* 186, 934–946.
- Dutta, S.K., Hollowell, G.P., Hashem, F.M., Kuykendall, L.D. (2003). Enhanced bioremediation of soil containing 2,4-dinitrotoluene by a genetically modified *Sinorhizobium meliloti*. *Soil Biology Biochemistry*. 35, 667-675.

- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67, 190-205.
- Galazka, A., Galazka, R. (2015). Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *dactylis glomerata* as the bioremediation plant. *Polish Journal Microbiology*. 64(3), 239-250.
- Harvey, C., Castro, P., Harmas, H., Lichtfouse, E., Schäffner, A., Smrcek, S., Werck, D. (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution Research*. 9, 29-47.
- Jiang, J., Liu, H., Li, Q., Gao, N., Yao, Y., Xu, H. (2015). Combined remediation of Cd-phenanthrene co-contaminated soil by *Pleurotus cornucopiae* and *Bacillus thuringiensis* FQ1 and the antioxidant responses in *Pleurotus cornucopiae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 120, 386-393.
- Jukes, T. H., Cantor, C.R. (1969). Evolution of Protein Molecules. In: Munro, HN, editors *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press. 21-132.
- Kim, S., Hwang, J., Chung, J., Bae, W. (2014). Enhancing trichloroethylene degradation using non-aromatic compounds as growth substrates. *Journal of Hazardous Materials*, 275, 99-106.
- López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M., Pérez, F., Gutiérrez, M. (2005). Phytoremediation mechanisms of contaminated soils with xenobiotic organic molecules. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21, 91-100 (In Spanish).
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Martins, M.F., Franco, A.A., Graham, P., Pardo, M. (1991). *Rhizobium tropici* a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal Systematic Bacteriology*. 41, 417-426.
- Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*. 59, 519-546.
- Peixoto, R.S., Vermelho, A.B., Rosado, A.S. (2011). Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *Enzyme Research*. 1-7.
- Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., Pinphanichakarn, P. (2006). Novel intermediates of

- acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. strain CU-A1: evidence for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism. *Applied Environmental Microbiology*. 72, 6034-6039.
- Radwan, S.S., Dashti, N., El-Nemr, I.M., Khanafer, M. (2007). Hydrocarbon utilization by nodule bacteria and plant grow promoting rhizobacteria. *International Journal Phytoremediation*. 9, 1-11.
- Saitou, N., Nei M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4), 406-25.
- Si-Zhong, Y., Hui-Jun, J., Zhi, W., Rui-Xia, H., Yan-Jun, J.I., Xiu-Mei, L.I., Shao-Peng, Y.U. (2009). Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. *Pedosphere*. 19, 371-381.
- Simon, M.F., Grether, R., Queiroz, L.P., Sarkinen, T.E., Dutra, V.F., Hughes, C.E. (2011). The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): towards a phylogeny of the sensitive plants. *American Journal of Botany*. 98, 1201–1221.
- Tamura. K., Peterson, D., Stecher, G., Filipski, A., Kumar, S., (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular. Biology. Evolution*. 28, 2731–2739.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX: windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24, 4876–4882.
- Weisburg, G.W., Barns, M.S., Pelletier, A.D., Lane, J.D. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*. 173, 697-03.
- Wong, V.A., Caballero, M.J. (2010). Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating Burkholderia species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. *Systematic and Applied Microbiology*. 33, 35-43.
- Xiao, J., Guo, L., Wang, S., Lu, Y. (2010). Comparative impact of cadmium on two phenanthrene-degrading bacteria isolated from cadmium and phenanthrene co-contaminated soil in China. *Journal of Hazardous Materials*. 174, 818-823.
- Yessica, G. P., Alejandro, A., Ronald, F. C., José, A. J., Esperanza, M. R., Samuel, C. S. J., Ormeño-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.