

Análisis fenotípico de *Pseudomonas fluorescens* crío preservada en diésel: aislada de humano

Molina González María Graciela*, Marín Rodríguez Andrea, Rodríguez García Michel Irais

Universidad Nacional Autónoma de México, Colección de Cultivos Bacterianos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Av. de los barrios No. 1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo Mex., C.P. 54090, México.

* Autor para correspondencia: marias@unam.mx

Recibido:

21/septiembre/2019

Aceptado:

04/noviembre/2019

Palabras clave:

Pseudomonas fluorescens,
criopreservación, diésel

Keywords:

Pseudomonas fluorescens,
cryopreservation, diesel

RESUMEN

Pseudomonas fluorescens LFS, forma parte de la colección de cultivos bacterianos de la FES-IZTACALA, y se ha conservado en medio mínimo salino con diésel, a 4°C durante tres años. El propósito de este trabajo fue evaluar si la cepa LFS de *P. fluorescens* mantiene las características bioquímicas, de sensibilidad antimicrobianos y su capacidad de crecer en diésel sin un criopreservante y temperatura de no congelación. Se pudo obtener un cultivo puro y viable, comparte las mismas características bioquímicas y de sensibilidad a antimicrobianos que la cepa de primoaislamiento criopreservada a -20°C con glicerol en medio infusión cerebro corazón. Conservo la habilidad de crecer en medio mínimo salino con diésel como única fuente de carbono, aunque más lento que el cultivo bacteriano antes de colocarlo a 4°C. Las características bioquímicas preliminares demuestran que la bacteria no ha sufrido cambio a diferencia de la morfología colonial y sensibilidad antimicrobianos.

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens, is part of the bacterial culture collection from FES-IZTACALA (UNAM), and it has been conserved in to minimum saline with diesel to 4°C during three years. The purpose of this investigation was to evaluate if the strain LFS of *P. fluorescens* keeps its biochemical characteristics, as well as its antimicrobial sensitivity and its capacity of growing up in diesel without a cryopreservant and to non-frostbite. We were able to obtain a pure and viable culture, which shares the same biochemical characteristics and sensitivity to antimicrobials that the strain of first isolation cryopreserved to -20°C with glycerol in infusion brain-heart. It conserved the ability of growing up in a minimum saline livelihood with diesel as its unique carbon source, but slower than the bacterial crop before putting it to 4°C. The preliminary biochemical characteristics prove that the bacteria haven't suffered any change, unlike the colonial morphology and antimicrobial sensitivity.

Introducción

El objetivo principal de cualquier colección de microorganismos es el mantenimiento de cultivos de reserva "stock" en estado viable y con características estables. La Colección de Cultivos Bacterianos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CCB-FESI), garantiza la viabilidad de más de 200 cepas bacterianas, que incluyen bacterias de origen humano, animal, agroforestal y de American Type Collection Culture (ATCC). Dependiendo de las actividades y objetivos de la CCB-FESI es el tipo de conservación que se utiliza. Los métodos de conservación empleados en el laboratorio son: almacenamiento a -20 y -70 y 4°C con criopreservantes. La conservación en nitrógeno líquido a -196 °C se considera el mejor método de preservación, reduce las posibilidades de contaminación y mutaciones. El almacenamiento a las temperaturas de -70 y -20 reduce efectos fenotípicos y cambios genéticos. Los microorganismos preservados en nitrógeno líquido comúnmente muestran altas velocidades de crecimiento y buena estabilidad de la cepa. Además, es un método relativamente sencillo, barato y se invierte poco tiempo (Novik et al., 2008-2009; Scales et al., 2014). Diversos factores son importantes para la criopreservación: cinética de criopreservación, condiciones de almacenamiento y recuperación, medio de cultivo, crioprotector, edad de la célula y tamaño de la población, todos ellos afectan la viabilidad y estabilidad de los cultivos bacterianos (Sánchez y Corrales, 2005). Algunas bacterias han presentado cambios si se alteran estas condiciones como las bacterias del género *Pseudomonas* (Scales et al., 2014).

Pseudomonas fluorescens es un complejo de especies bacterianas en forma de bacilos Gram-negativo, saprofitas. Se pueden encontrar en ecosistemas acuáticos y en el suelo, no forman esporas y el rango de temperatura más favorable para su desarrollo es de 25 a 30°C, aunque pueden crecer desde 5°C a 42°C (Pérez et al., 2015). En los últimos años ha habido un interés creciente en la capacidad de degradar diversos hidrocarburos por *P. fluorescens* (Wilson y Bradley, 1996; Abbasian et al., 2015; Montánchez et al., 2017; Krisdawati et al., 2018) siendo el origen de los aislados suelo, planta y ambiental. Lo que confirma el amplio potencial de esta especie para adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales, tales como variaciones de temperatura y diversas fuentes de carbono, gracias a su metabolismo altamente versátil y la plasticidad de su genoma (Mazurier et al., 2015; Montánchez et al., 2017).

En relación a lo anterior el laboratorio de Colección de Cultivos Bacterianos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CCB-IZTA) cuenta con varias cepas de *P. fluorescens* aisladas de lavados bronquiales de humano, una de estas con clave LFS, mostró la capacidad

de crecer en diésel y producir ramnolípidos (datos no publicados), la cepa se mantiene en refrigeración (4°C) en medio mínimo salino y diésel al 1% desde hace aproximadamente 3 años. Dado que *P. fluorescens* se le considera como una bacteria emergente, resulta relevante el estudio de la bacteria aislada de origen humano, en particular lo relacionado con los cambios en sus características fenotípicas.

Por lo que el propósito de este trabajo fue evaluar los posibles cambios fenotípicos de la cepa LFS de *Pseudomonas fluorescens* aislada de un lavado bronquial, sensibilizada con diésel como única fuente de carbono para su crecimiento y almacenada en medio mínimo salino con diésel a 4°C. Para lo cual estudiamos el efecto de la temperatura, el medio de almacenamiento y el criopreservante en la viabilidad, morfología colonial y microscópica, características bioquímicas, sobrevivencia y crecimiento en diésel.

Metodología

Cepas bacterianas y Criopreservación de *Pseudomonas fluorescens*

Las cepas utilizadas en el presente estudio fueron proporcionadas por la Colección de Cultivos Bacterianos (CCBIZTA) de la FES-Iztacala UNAM.

Se trabajaron con dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* LFS, para indicar que fue un aislado de lavado bronquial de un paciente de un hospital de salubridad (García, 2015) se le asignó el código de LFSH y a otra adaptada con diésel al 1% se le nombró LFSD. Se utilizaron *Klebsiella pneumoniae* (M clave interna de CCB-Izta) y *Escherichia coli* (Ec4 clave interna) como cepas control de las pruebas bioquímicas, principalmente en relación a la fermentación de los carbohidratos (Mac Fadding, 1993). Las cepas están almacenadas en congelación a -20°C, con excepción de LFSD que se encuentra a 4°C, sin preservante.

Activación de *Pseudomonas fluorescens*

Las bacterias se recuperaron de los cultivos criopreservados. Se realizó un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* en medio BHI y se dejó crecer durante 24-48 horas a 30°C ±2°C. Después del cual se estandarizó el tiempo de crecimiento a 24 h y 30°C. Se revisó pureza y morfología colonial.

Características fenotípicas

Descripción de morfología colonial y microscópica

Una vez activadas las cepas se describió la forma y el color de las mismas. Para la morfología microscópica se utilizó la técnica de tinción Gram.

Pruebas bioquímicas

Se ejecutó una batería de pruebas bioquímicas de acuerdo a lo sugerido por Cowan y Steel en 1996. Se utilizó el citrato como única fuente de carbono, se percibió la presencia de las enzimas oxidasa y catalasa, metabolismo de oxidación-fermentación, producción de indol, fermentación de glucosa y lactosa, producción de gas y SH₂ en el medio agar de hierro de Kligler. También se examinó la movilidad de la bacteria mediante la prueba de gota pendiente.

Sensibilidad antimicrobiana

El ensayo de sensibilidad antimicrobiana estuvo de acuerdo al The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018. Los antibióticos utilizados fueron: piperacilina tazobactam, ceftazidima, gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg) y levofloxacin (5 µg).

Ensayo de crecimiento en diésel

P. fluorescens almacenada en medio mínimo salino con diésel (MMS 1%): NaCl, KCl, MgSO₄ 7H₂O, NH₄NO₃, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄ 2H₂O, microelementos MgSO₄, FeSO₄, MnSO₄, CaCl₂, BaCl₂, CuSO₄, EDTA, H₃BO₃, NaHPO₄, NaCl, KH₂PO₄ y NH₄CL, desde el 2016 se reactivó en el mismo medio con diésel a 32°C 120 rpm y al llegar a la fase exponencial de crecimiento, se utilizó para el experimento de crecimiento en diésel.

Se inocularon al 5% v/v matraces conteniendo 95 mL de medio mínimo salino (MMS), complementado con diésel al 1 y 4% v/v, 1% de glicerol, respectivamente, como única fuente de carbono, y sin fuente de carbono. Los cultivos se colocaron en agitación continua (120rpm) a 30° C. Con una alícuota de 1ml de cada matraz a las 24, 48 y 72 h se monitoreo el crecimiento bacteriano con espectrofotómetro a 620 nm. Al final del experimento se tomó una muestra de los matraces y se creció en agar Mac ConKey para visualizar morfología colonial y que se mantuvieran vivas las bacterias. El ensayo de crecimiento en diésel se llevó a cabo de conformidad al trabajo de Luo *et al.* 2015.

Los ensayos de sensibilidad y de crecimiento en diésel se replicaron cinco veces, se calculó el error estándar y análisis de ANOVA.

Resultados y discusión

Características fenotípicas

Morfología y características bioquímicas de las cepas

La congelación bacteriana es un método fisicoquímico que permite conservar microorganismos viables sin sufrir cambios genotípicos y fenotípicos, la bacteria debe adaptarse al nuevo ambiente, modificar la velocidad del metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los

cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasionen algún daño (Sánchez y Corrales, 2005). La temperatura es relevante al momento de conservar cultivos bacterianos siendo -196 y -70°C las de primera elección puesto que reducen la posibilidad de algún cambio. Estas temperaturas se logran gracias a los tanques de nitrógeno líquido o ultracongeladores, no obstante, para algunos laboratorios es más accesible tener congeladores con temperatura de -20°C. En este sentido nosotros en un trabajo previo observamos que la viabilidad de tres cepas de *Pseudomonas* incluida la especie *fluorescens* no se vió afectada (Monsalvo-Reyes *et al.*, 2018), el mismo resultado se percibió en las dos cepas bacterianas utilizadas para el presente estudio y resguardadas en el Laboratorio de Colección de Cultivos Bacterianos de la FES Iztacala (CCBIZTA).

Algunos autores plantean que la congelación y descongelación puede causar daño oxidativo y por tanto mutagénesis; en ambas cepas *P. fluorescens* de hospital (LFSH) y *P. fluorescens* (LFSH) almacenada en diésel, cuando se comprobó el fenotipo como criterio de estabilidad genética, distinguimos cambios en el tamaño de la colonia crecida en agar Mac Conkey; para la cepa LFSH, se observaron colonias pequeñas redondas de color café claro con crecimiento a las 12 horas. Para la cepa de LFSH se percibieron colonias redondas de color café más grandes que la cepa LFSH, por lo que se verificó el crecimiento en medio Flo para la producción de pigmento (Fig. 1). Los marcadores bioquímicos y de morfología microscópica permanecieron iguales (Tabla 1). Ambos tienen forma bacilar, Gram negativos no fermentadoras y tienen activas las enzimas catalasa y oxidasa. Nuestros resultados están en concordancia con lo reportado por (Novik *et al.*, 2009; Pérez-Reytor y Sosa, 2010; Mputu *et al.*, 2012).

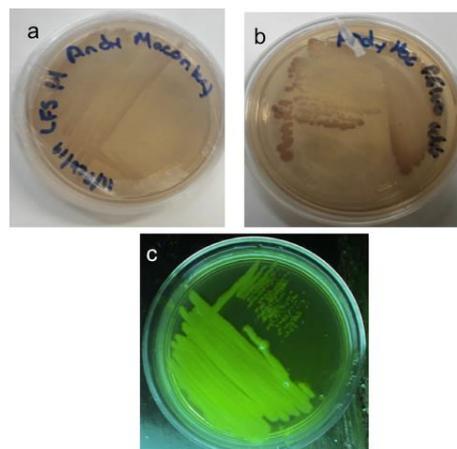


Figura 1. Morfología colonial de las cepas *Pseudomonas fluorescens*, **A.** aislada de lavado bronquial de un paciente de hospital (LFS) y criopreservada con suero fetal bovino, **B.** LFSH adaptada al crecimiento con diésel y almacenada a 4°C sin protector (LFSH), **C.** LFSH crecida en medio Flo, se aprecia la producción de pigmento.

Tabla 1. Características bioquímicas y de movilidad de las cepas *Pseudomonas fluorescens* H y D. *Cepas control en las pruebas bioquímicas.

	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LFS D)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LFS)	<i>Escherichia coli</i> (4)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (M)
Tinción de Gram	bacilos Gram negativos	bacilos Gram negativos	bacilos Gram negativos	bacilos Gram negativos
MacConkey	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	-	-
Prueba de O/F	O	O	F	F
Kligler	Producción de gas	-	+	-
	Producción H₂S	-	-	-
Superficie/Profundidad	Alcalina	Alcalina	Alcalina	Alcalina
Citrato	+	+	-	+
Indol	-	-	+	+
Movilidad	+	+	+	-

Características de sensibilidad antimicrobianos

En cuanto a la prueba de sensibilidad a antimicrobianos, la cepa de *Pseudomonas fluorescens* no pierde su sensibilidad a los antibióticos utilizados, Piperacilina-Tazobactam, Ceftazidima, Gentamicina, Tobramicina y Levofloxacin, estos pertenecen al Grupo A según la guía 2018 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI por sus siglas en inglés) que son los antimicrobianos de primera elección en las pruebas de sensibilidad para el género *Pseudomonas*.

Las cepas LFSH y LFS D de *P. fluorescens* presentaron inhibición del crecimiento ante los cinco antibióticos probados (Fig. 1). Los antimicrobianos tobramicina y gentamicina provocaron mayor inhibición en la cepa LFSH, no hubo diferencias en los piperacilina-tazobactam, ceftazidima y levofloxacin. Para la cepa LFS D, levofloxacin inhibió en mayor grado el crecimiento, en los antibióticos restantes no se advirtieron diferencias. El efecto de inhibición de gentamicina y tobramicina sobre crecimiento de LFS D disminuyeron, por lo contrario de levofloxacin. Las diferencias significativas se observaron con base al análisis estadístico con una p 0.05.

Es importante resaltar que los halos de inhibición para los 5 antibióticos, fueron de mayor diámetro al sugerido por la CLSI para clasificar como "sensible"; siendo 21 mm para piperacilina-Tazobactam, 18 mm para Ceftazidima, 15 mm para Gentamicina, 15 mm para Tobramicina y 17 mm para Levofloxacin. Por lo que no muestra resistencia adquirida a pesar de ser una cepa originaria de un hospital, al contrario de lo que Trivedi et al reportaron en 2015; que *Pseudomonas fluorescens* se volvió resistente a diversos antibióticos entre ellos ceftazidima y piperacilina, utilizados también en este trabajo, y con sensibilidad intermedia ante el antibiótico Tobramicina. Empero no hay que subestimar el cambio en la sensibilidad a levofloxacin para la cepa LFS D.

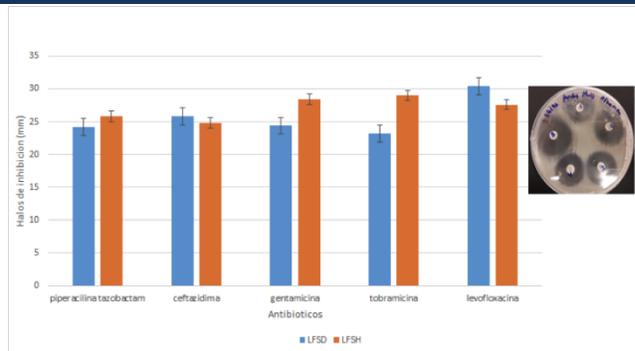


Figura 2. Sensibilidad de las cepas *Pseudomonas fluorescens*, LFSH y LFS D a cinco antibióticos. Promedio de cinco repeticiones y error estándar.

Es conveniente mencionar que, en un estudio previo, encontramos que *P. fluorescens* crecida en diésel LFS D y almacenada a -20°C , no presentó cambios en las características bioquímicas y morfológicas, aunque fue más sensible a los mismos antibióticos estudiados en este trabajo (datos no reportados). En un estudio posterior sería interesante conocer si conserva la característica de utilizar el diésel como única fuente de carbono.

Ensayo de crecimiento en diésel de *Pseudomonas fluorescens* LFS D

La capacidad de utilizar el diésel como única fuente de carbono por *Pseudomonas fluorescens* cepa LFS D se investigó por inocular la bacteria en medio mínimo salino (MMS) con diésel y monitorear el crecimiento por densidad óptica (DO_{620}), en la figura 3 se puede observar que la cepa *Pseudomonas fluorescens* LFS D que se mantuvo almacenada a 4°C con diésel, tuvo crecimiento en MMS con glicerol o diésel. No hay diferencias significativas entre los tratamientos con glicerol y diésel, con una $p=0.005$. El crecimiento de la bacteria en MMS con diésel al 1 y 4% y glicerol al 1% se clasificó como crecimiento bajo, de acuerdo a Rhaman et al (2002) citado por Thalaiekhosani et al (2015), quienes jerarquizan el crecimiento bajo a DO_{600} en el rango de 0.21-0.40, moderado de 0.41-0.60, alto 0.61-0.80 y crecimiento excelente en el rango de 0.81-1.0. La capacidad de crecer en diésel de la cepa LFS D no se modificó, además al aumentar la concentración de diésel (4%) el crecimiento se mantuvo, los resultados coinciden con lo encontrado por Cabrefiga et al en 2014, quienes demostraron que diversas cepas de *P. fluorescens* mantuvieron la propiedad de biocontrol sobre *Erwinia amylovora*.

Mayz y Manzi en 2017 reportaron el aislamiento de varias especies del género *Pseudomonas* de las raíces de leguminosas expuestas a contaminación por hidrocarburos, llamando a estas bacterias hidrocarburoclásticas. De acuerdo a los resultados de este trabajo, se comprobó la capacidad

hidrocarburoclástica de *Pseudomonas fluorescens* LFSD, ya que la cepa almacenada en refrigerador a 4°C con MMS con diésel desde 2016 creció después de 3 años degradando el diésel en concentraciones de 1% y 4% durante un tiempo prolongado, puesto que el incremento de la cantidad de bacterias se mantuvo al alza en 480 h incubación. Así mismo la cepa de *Pseudomonas fluorescens* LFSD no tuvo cambios fenotípicos aun estando en condiciones de estrés como lo fue la temperatura de preservación (4°C) y el diésel como fuente de carbono; a comparación de lo registrado por Trivedi et al en el 2015, que observaron cambios fenotípicos y alteraciones enzimáticas, propiciado por cambios genéticos, de tal suerte que se identificó como *Vibrio fluvialis* y *Enterobacter cloacae* en pruebas de biología molecular en lugar *Pseudomonas fluorescens*. Nosotros esperamos que en un análisis molecular posterior las cepas utilizadas en este trabajando mantengan la ubicación taxonómica.

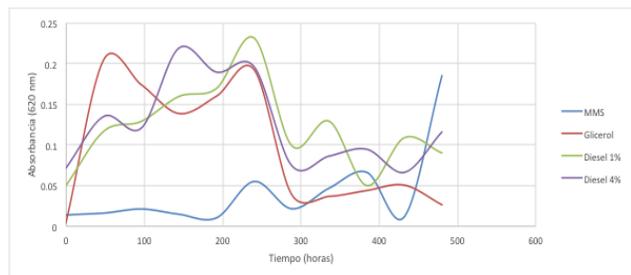


Figura 3. Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* LFSD al 1% y 4% con diésel como fuente de carbono. No hay diferencias significativas entre los grupos con excepción del crecimiento en medio mínimo salino sin fuente de carbono, $p < 0.05$

La cepa de *Pseudomonas fluorescens* almacenada en refrigerador con diésel no mostró diferencia en cuanto a metabolismo, se ha demostrado en varios trabajos como el de Zanaroli et al., 2010 que la criopreservación no suele afectar a las bacterias metabólicamente hablando. Aunque algunos trabajos como el de Sánchez y Corrales en 2005 observaron que un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* presentó un periodo de crecimiento disminuido durante los primeros cultivos después de la reactivación del cultivo.

El diésel no es un agente de conservación sin embargo este estudio demostró que *Pseudomonas fluorescens* LFSD se mantuvo viable durante 3 años a 4°C almacenada con medio mínimo salino. Aun cuando la temperatura, fuente de carbono y nutrientes fueron atípicos a la usual conservación de cepas, el que la cepa LFSD conservará sus características, es el principal aporte del presente reporte.

Conclusiones

La cepa de *Pseudomonas fluorescens* almacenada en refrigerador con diésel no presentó diferencia en cuanto a metabolismo con la cepa del primer aislamiento, pero si una ligera variación colonial en tamaño.

No se observaron cambios en la sensibilidad antimicrobiana. La actividad de biodegradación de diésel se mantuvo después de la criopreservación. La aportación principal de este trabajo es que demostró la viabilidad y conservación de *P. fluorescens* con diésel en medio mínimo salino, en preservación a 4°C.

Referencias

- Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R.A. (2015). Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Rev. Appl. Biochem Biotechnol*, 176 (3), 670-99.
- Cabrefiga J., Francés J., Montesinos E., y Bonaterra. (2014). Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e for fire Bligh disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying lyoprotectant. *J. Applied Microbiol.* 117, 1122-1131.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cowan S.T., Steel K.J. (2003). Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 3^a CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, pp.21-48.
- García R.J.A. (2015). Aislamiento de Bacterias Aerobias en Lavados Bronquiales de Pacientes del Hospital General de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Luo Q., He Y., Deng-Yong H., Jian-Guo Z., Xian-Rong S. (2015). GPo1 alkB gene expression for improvement of the degradation of diesel oil by a bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (3), 649-657.
- Mac Fadding J.F. (1993). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana, México, p27-37.
- Mayz J., Manzi L. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) *Merr. Rev. Colomb. Biotecnol.* XIX (1), 29-37.

- Mazurier S., Merieau A., Bergeau D., Decoin V., Sperandio D., Crépin A., Barbey C., Jeannot K., Viché-Gibouin M., Plésiat P., Lemanceau P. and Latourb X. (2015). Type III Secretion System and Virulence Markers Highlight Similarities and Differences between Human- and Plant-Associated *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Rev. Applied and Environmental Microbiology*, 81 (7), 2579-259.
- Monsalvo-Reyes A.C., Sánchez J.R., Molina-González M.G. (2019). Caracterización parcial fenotípica y del 16S rDNA de bacterias promotoras para del desarrollo vegetal. *Revista tendencias de investigación y docencia en química*, 4;674-680.
- Montánchez I., Kaberdina A.C., Sevillano E., Gallego L., Rodríguez-Couto S., Kaberdin V.R. (2017). Isolation of *Pseudomonas fluorescens* species highly resistant to pentachlorobenzene. *Rev.Folia Microbiol*, 62, 325.
- Mputu K.J.N., Destain J., Noke P., Thonart P. (2012). Accelerated storage testing of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* BTP1, BB2 y P19 strains. *African J. Biotechnol.*, 11(95), 16187-16191.
- Novik G., Sidarenka A., Rakhuba D., Kolomiets E. (2008-2009). Cryopreservation of bifidobacteria and bacteriophages in Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. *Journal of Culture Collections*, 6, 76-84.
- Pérez A. S., Coto A. O., Echemendía P.M. y Ávila Q. G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Rev. Protección Veg.*, 30(3), 225-234.
- Pérez-Reytor D.C., Espinosa S.A.E. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli K12* de uso frecuente en biotecnología. *VacciMonitor*, 19(2),11-17.
- Sánchez L. L. C. y Corrales R. L. (2005) Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *NOVA-PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*, 3(3), 109-113
- Scales S.B., Dickson P.R., LiPuma J.J. and Huffnagle B. G. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927-948.
- Talaiekhosani A., Jafarzadeh N., Fulazzaky M.A., Talaie M.R., Beheshti. (2015). Kinetics of substrate utilization and bacterial growth of crude oil degraded by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Env H S and Eng*, 13(64), 2-8.
- Trivedi MK., Patil S, Shettigar H, Gangwar M, Jana S (2015) Antimicrobial Sensitivity Pattern of *Pseudomonas fluorescens* after Biofield Treatment. *J Infect Dis Ther.* 3, (222).
- Wilson N.G., Bradley G. (2008). Enhanced degradation of petrol (Slovene diesel) in an aqueous system by immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Rev. Journal of Applied Microbiology*, 80 (1), 99 - 104.
- Zanaroli G., Toro S., Todaro D., Varese G.C., Bertolotto A., Fava F. (2010). Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Rev. Microb Cell Fact.* 16, 9:10.