



# Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios procedentes de cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

## Isolation and characterization of rizobia strains from chickpea nodules (*Cicer arietinum* L.)

 Marisel Ortega-García<sup>1\*</sup>,  Yoania Ríos-Rocafull<sup>1</sup>,  
 Bernardo Dibut Álvarez<sup>1</sup>,  María Caridad Nápoles García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), calles 188 #38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, Boyeros, La Habana, Cuba. C.P. 10800

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

**RESUMEN:** El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una leguminosa de amplia aceptación en Cuba, que además de su aporte nutricional tiene como atractivo el ser una especie tolerante a condiciones ambientales adversas. Los rizobios que habitan en el interior de los nódulos de las plantas de garbanzo aportan beneficios al cultivo, por lo que podrían ser utilizados para elevar sus rendimientos y así extender el cultivo en el país. El presente estudio tuvo como objetivos obtener aislados de posibles rizobios asociados a diferentes variedades de garbanzo y tipos de suelos en Cuba, así como caracterizarlos en cuanto a su tolerancia a distintos valores de pH y temperatura. Se purificaron 63 aislados bacterianos obtenidos de siete variedades de garbanzo sembradas en cuatro tipos de suelos. De ellos, se seleccionaron 11 como posibles rizobios por sus características morfo-fisiológicas y bioquímicas. Tres de estos aislados se destacaron por tolerar tanto valores ácidos como básicos de pH y altas temperaturas, por lo que se consideran promisorios para constituir principios activos de nuevos inoculantes para esta especie vegetal.

**Palabras clave:** leguminosas, cultivo, selección.

**ABSTRACT :** Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is a leguminous of wide acceptance in Cuba; it constitutes tolerant specie to adverse environmental conditions, besides their nutritional contribution. Rizobia, which habit inside the chickpea nodules, contribute with benefits to the plant that is why they could be used to elevate their yields and to extend the crop in the country. The objective of this study was to obtain isolates of possible rizobia associated with different chickpea varieties and soil types in Cuba, as well as to characterize them in terms of their tolerance to different pH and temperature values. From seven chickpea varieties sowed in four soil types, 63 bacterial isolates were purified. From them, 11 isolates as possible rizobios by their morphophysiological and biochemical characteristics were selected. Three of these isolated stood out by tolerate acids and basic pH values and high temperatures, so they could be promissory to constitute active ingredients of new inoculants for this vegetable specie.

**Key words:** leguminous, growth, selection.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de las leguminosas, el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se destaca por ser una especie de interés para el

consumo humano y animal (1). Los estudios de diversidad de bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPB, por sus siglas en inglés, Plant Growth Promoting Bacteria) que se asocian al garbanzo, durante largo tiempo se

\*Autor para correspondencia: [mariselortega9@gmail.com](mailto:mariselortega9@gmail.com), [dir\\_cientifica@inifat.co.cu](mailto:dir_cientifica@inifat.co.cu)

Recibido: 02/08/2022

Aceptado: 08/10/2022

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses

**Contribución de los autores:** **Conceptualización-** Marisel Ortega-García. **Investigación-** Marisel Ortega-García, Yoania Ríos-Rocafull, Bernardo Dibut Álvarez, María Caridad Nápoles García. **Metodología-** Marisel Ortega-García, Yoania Ríos-Rocafull. **Supervisión-** Bernardo Dibut Álvarez, María Caridad Nápoles García. **Escritura del borrador inicial, Escritura y edición final y Curación de datos-** Marisel Ortega-García.

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



limitaron al género *Mesorhizobium*, con las especies *Mesorhizobium ciceri*; *Mesorhizobium mediterraneum*; *Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium tianshanse*; *Mesorhizobium muleiense* y *Mesorhizobium wenxiniae*. Posteriormente, se ha descrito la presencia de nuevos géneros y especies, lo que denota la existencia de una amplia diversidad genética que se asocia a este cultivo (2).

Como parte de la estrategia para incrementar los rendimientos de garbanzo en Cuba, ante la modificación del pH de los suelos y las altas temperaturas ocasionados por el cambio climático (3), se podrían utilizar los microorganismos asociados de manera natural a esta especie vegetal, como complemento en su nutrición y adaptación, lo que justifica su aislamiento y caracterización.

El presente estudio tuvo como objetivo obtener aislados de posibles rizobios asociados a diferentes variedades de garbanzo y tipos de suelos en Cuba, así como caracterizarlos en cuanto a su tolerancia a distintos valores de pH y temperatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de los aislados

El aislamiento de posibles rizobios se realizó en 43 sitios, a partir de nódulos provenientes de cinco plantas sanas y vigorosas de siete cultivares de garbanzo (Nacional-6, Nacional-24, Nacional-27, Nacional-29, Nacional-30, PJ-94 y Jamu-96), en la etapa de la floración. Las plantas se encontraban distribuidas en diferentes escenarios productivos de nueve provincias del país (Pinar del Río, La Habana, Artemisa, Mayabeque, Santi Spíritus, Cienfuegos, Granma, Las Tunas y Guantánamo) y sobre cuatro tipos de suelos (Alfítico, Ferralfítico, Fersialfítico y Sialfítico).

Una vez retirados los nódulos de las plantas, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron en tubos de ensayo que contenían 15 mL de agua destilada estéril y se maceraron. Cada extracto se inoculó en el medio de cultivo Levadura Manitol Agar (LMA) con Rojo Congo (4) y se incubaron las placas a 28-30 °C de temperatura, durante 72 horas. La purificación de los microorganismos se realizó en este mismo medio de cultivo.

### Caracterización morfo-fisiológico y bioquímica de los aislados

Se determinó la morfología de las colonias, tamaño y bordes, mediante su observación en microscopio estereoscópico Leica KL 300 LED (3X), mientras que la caracterización microscópica y tintorial se realizó a partir de una tinción de Gram (5) y la observación en un microscopio óptico (Leica DM300 (1 000 X de aumento)).

Se evaluó, también, la producción de ácidos o bases por parte los aislados y la producción de cetolactasa. En el primer caso, se utilizó el medio de cultivo LMA (4) con azul de bromotimol y se realizó la incubación durante siete días

a 28-30 °C de temperatura. Para el segundo, se usó el medio de cultivo Levadura Lactosa Agar (LLA) (6).

Para la caracterización fisiológico-bioquímica se ejecutaron diferentes pruebas, según las referencias de (7). En todos los casos, se partió de la inoculación con un cultivo de 24 horas en medio LMA con Rojo Congo (4). Se incubó durante dos a cinco días a una temperatura de 28-30 °C y se realizaron las pruebas por triplicado. Las pruebas incluyeron presencia de las enzimas citocromo oxidasa y catalasa, hidrólisis del almidón, gelatina y caseína, utilización de citrato como fuente de carbono, producción de indol a partir de triptófano, fermentación de la glucosa, utilización de azufre y motilidad, esta última por el método de la gota colgante. Además, se determinó la capacidad de los aislados para degradar celulosa, para lo que se utilizó un medio de cultivo suplementado con 10 g de celulosa cristalina, en el que se inocularon los microorganismos. Se consideró positiva la prueba al presentarse una zona traslúcida alrededor del crecimiento bacteriano.

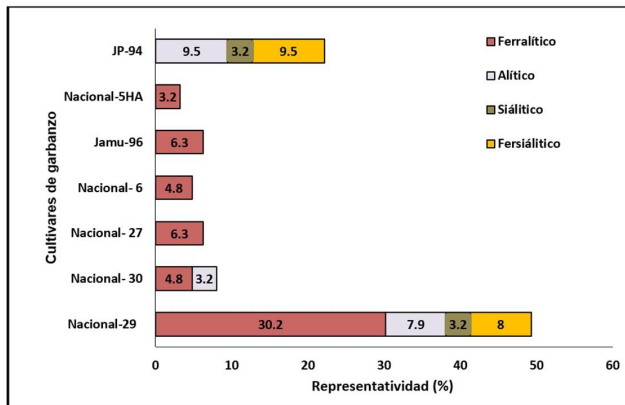
### Evaluación de la tolerancia de los aislados a diferentes valores de pH y temperatura

El medio de cultivo líquido LM (4) se ajustó a diferentes valores de pH (3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 y 9,5) con HCl o NaOH 1N. En todos los casos, se inocularon los aislados de forma independiente y se colocaron en un agitador orbital a 200 r.p.m, durante 48 horas, a una temperatura de 28-30 °C. Se tomó como criterio positivo el crecimiento visible por turbidez en el medio de cultivo y como negativo, la ausencia de crecimiento por transparencia del medio. Para determinar la tolerancia a diferentes temperaturas se utilizó el medio de cultivo LMA, donde se sembraron los aislados mediante una estría central y posteriormente se incubaron a 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40 °C de temperatura. Se consideró positiva la prueba al crecer el microorganismo y negativa ante la ausencia de crecimiento. En ambas determinaciones, los aislados se inocularon a partir de un cultivo joven de 24 horas en el medio de cultivo LMA con Rojo Congo y se incubaron durante dos a cinco días a una temperatura de 28-30 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez se procesaron los nódulos de las plantas de las diferentes variedades de garbanzo, se purificaron los 63 aislados bacterianos que no fijaron el Rojo Congo presente en el medio de cultivo, indicador inicial de selección por ser una de las características distintivas de los rizobios (5). El 49,2 % de las muestras procedieron de la variedad Nacional-29, el 22,2 % correspondieron a la variedad JP-94, mientras que sólo el 3,2 % de los nódulos se obtuvo desde la variedad N5-HA. Con respecto a los suelos, la mayor parte de los nódulos se colectaron de plantas crecidas en suelos Ferralfíticos, con un 55,6 % de las muestras; el 20,6 % se obtuvo de suelos Alfíticos y el

17,5 de los Ferralíticos, mientras que la menor cantidad se obtuvo de suelos Sialíticos (6,3 %) (Figura 1).



**Figura 1.** Representatividad de suelos y cultivares en el aislamiento de posibles rizobios asociados al garbanzo

Una de las causas fundamentales que condicionó el aislamiento de un mayor número de microorganismos de la variedad Nacional-29 y de suelos Ferralíticos, es que ambos fueron los más representativos en los sitios de muestreo. La variedad Nacional-29 se ha destacado por su adaptabilidad a diferentes suelos y condiciones

edafoclimáticas (8), por lo que es la más extendida en Cuba, mientras que el agrupamiento Ferralítico, más específicamente los del tipo Ferralíticos rojos, ocupa alrededor de 700 000 ha y han sido tradicionalmente los más utilizados para la producción de alimentos por su alta productividad y el potencial que representan para la captura de carbono (9)

### Caracterización morfo-fisiológica y bioquímica de los aislados

La morfología de los aislados purificados desde los nódulos de las diferentes variedades de garbanzo fue heterogénea y se pudieron identificar tres tipos de morfología celular, con predominio de la forma cocobacilar. El grupo más representativo, con un 24 % de aislados, correspondió a cocobacilos esporulados Gram positivos; mientras que el grupo más pequeño (15 % de los aislados) perteneció a los cocobacilos no esporulados Gram negativos (Tabla 1), morfología que se corresponde con la de los rizobios (5). Estos microorganismos fueron seleccionados para su posterior caracterización.

Todos los aislados mostraron colonias pequeñas o medianas, de coloración translúcida, blanquecina o ligeramente rosada en el centro, sin absorción de Rojo Congo y con la mucosidad típica de los rizobios.

**Tabla 1.** Características micromorfológicas y tintoriales de aislados bacterianos procedentes de nódulos de plantas de garbanzo de diferentes cultivares y suelos de Cuba

Características morfológicas y tintoriales	Cultivares/Suelos	Número de aislados
	<b>Nacional-6/ Ferralíticos</b>	
Bacilos esporulados, Gram positivos		3
<b>Cocobacilos no esporulados, Gram negativos</b>		1
	<b>Nacional-27/ Fersialíticos</b>	
Cocobacilos esporulados, Gram positivos		2
	<b>Nacional-27/ Ferralíticos</b>	
Cocos no esporulados, Gram positivos		6
	<b>Nacional-29/ Ferralíticos</b>	
Cocobacilos esporulados, Gram negativos		8
<b>Cocobacilos no esporulados, Gram negativos</b>		5
Cocobacilos gruesos y bacilos gruesos no esporulados, Gram negativos		3
	<b>Nacional-29/ Alíticos</b>	
<b>Cocobacilos, bacilos finos ó redondeados no esporulados, Gram negativos</b>		3
Bacilos y cocobacilos esporulados, Gram positivos		8
	<b>Nacional-30 Sialíticos</b>	
Cocos no esporulados, Gram positivos		4
Bacilos esporulados, Gram negativos		5
	<b>Nacional 5HA/ Ferralíticos</b>	
<b>Cocobacilos no esporulados, Gram negativos</b>		1
Cocobacilos esporulados, Gram positivos		6
	<b>JP-94 /Alíticos</b>	
<b>Cocobacilos no esporulados, Gram negativos</b>		1
Bacilos esporulados, Gram positivos		5
	<b>JP-94 / Ferralíticos</b>	
Cocos no esporulados, Gram positivos		4
	<b>JAMU-96/ Ferralíticos</b>	
Cocos no esporulados, Gram positivos		5
Bacilos curvados no esporulados, Gram positivos		3

Se resaltan los grupos con características similares a rizobios

De los 11 aislados seleccionados, nueve se caracterizaron por presentar colonias de 1 mm de diámetro y, sólo dos formaron colonias de 4 mm. Todas las colonias fueron circulares, convexas y mucilaginosas, cuatro presentaron una coloración beige, tres blancas, dos blanquecinas o ligeramente rosadas en el centro y dos translúcidas, aspectos que coinciden con los descritos para la familia de los rizobios (5). De ellos, 8 se obtuvieron de la variedad Nacional-29, y los otros 3 correspondieron a los cultivares Nacional-6, Nacional 5HA y JP-94. En cuanto a la velocidad de crecimiento, siete de los aislados crecieron entre 2 y 3 días, mientras que los otros cuatro aislados se multiplicaron entre 7 y 9 días. Los 11 aislados produjeron ácidos en el medio de cultivo y mostraron un resultado negativo para la producción de cetolactasa.

En los últimos años, se ha demostrado que en los nódulos de las leguminosas conviven, junto a los rizobios, poblaciones de bacterias de la zona rizosférica que no tienen la capacidad de formar estas estructuras (10). Para el caso del garbanzo, aunque en la mayoría de los estudios se relaciona el género *Mesorhizobium* como el más representativo, se ha descrito la presencia de nuevos géneros vinculados a este cultivo, como *Achromobacter xylooxidans*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* (11), *Burkholderia andropogonis* y *Ochrobactrum ciceri* (12), entre otros. Estos resultados demuestran que es posible en los aislamientos iniciales purificar microorganismos que no pertenezcan necesariamente al grupo de los rizobios, tal y como sucedió en la presente investigación.

Las distintas velocidades de crecimiento que mostraron los 11 aislados seleccionados permitieron categorizar siete con crecimiento rápido (2-3 días), los que podrían ser miembros de la familia *Rhizobiaceae*, donde se incluyen los géneros *Ensifer*, *Rhizobium* y *Shinella*; mientras que los cuatro restantes se incluyen dentro del grupo de crecimiento lento (4- 7días), donde se incluye el género *Bradyrhizobium* (10). La producción de ácido en el medio

de cultivo y la respuesta negativa para la prueba de cetolactosa ratifica para estos 11 microorganismos su categorización dentro de la familia *Rhizobiaceae* (5).

Los 11 aislados seleccionados como rizobios presentaron una respuesta positiva a las pruebas de oxidasa, catalasa, hidrólisis de caseína, utilización de citrato y motilidad; y negativa a la hidrólisis de almidón y de gelatina, la producción de indol a partir del triptófano, el uso de azufre a partir del crecimiento en medio Kliger y la degradación de la celulosa. Sin embargo, mostraron diferencias en cuanto a la fermentación de azúcares, determinada por las pruebas de Rojo Metilo y Vogues Proskauer, ya que siete de ellos (R1, R2, R3, R8, R19, R27 y R29) fermentaron la glucosa, mientras que cuatro (R1N, R9, R13 y R17) no lo hicieron (Tabla 2).

Los rizobios se describen, en el Manual de Sistemática para Bacterias (13), como bacterias con respuesta positiva frente a la prueba de la catalasa y la oxidasa, que no hidrolizan almidón ni gelatina y si caseína, utilizan citrato como fuente de carbono y tienen una respuesta negativa en el medio Kliger (14) y a la producción de indol a partir del triptófano (15), con cepas que utilizan glucosa como fuente de carbono. Estas características son similares a los que presentaron los once aislados seleccionados. Por lo tanto, la caracterización fisiológica realizada también refuerza su inclusión dentro del grupo de los rizobios.

### Evaluación de la tolerancia de los aislados a diferentes valores de pH y temperatura

Ninguno de los 11 aislados creció a pH entre 3 y 5, ni a pH 9,5, mientras que el resto de los valores si mostraron diferencias entre los microorganismos; en tanto, a valores de pH entre 6,0 y 7,0 crecieron todos los aislados, a pH 5,5 solamente lo hicieron los aislados R1, R2, R3 y R19. Cuando el medio de cultivo presentó un pH 7,5, la mayor parte de los microorganismos mostró un crecimiento

**Tabla 2.** Características fisiológico-bioquímicas de posibles rizobios aislados de nódulos de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

Aislado	Ox	Cat	Alm	Gel	Cas	Cit	Ind	VP	RM	Kli	Cel	Mot
R1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
R2	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
R3	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
R1N	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
R8	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
R9	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
R13	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
R17	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
R19	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
R27	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
R29	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+

Ox: actividad enzimática oxidasa, Cat: catalasa, Alm: Hidrólisis de almidón, Gel: Hidrólisis de gelatina, Cas: Hidrólisis de caseína, Cit: utilización de citrato como fuente de carbono, Ind: producción de indol a partir del triptófano, VP: fermentación de la glucosa mediante Vogues Proskauer, RM: fermentación de la glucosa mediante Rojo de Metilo, Klig: uso de azufre a partir del crecimiento en medio Kliger, Cel: Degradación de celulosa y Mot: motilidad

positivo, a excepción del aislado R8; pero valores superiores (pH entre 8,5 y 9,0), afectaron el crecimiento, aunque se puede destacar que R1, R2 y R3 presentaron una mayor tolerancia y, particularmente, el aislado R3, fue el único que creció cuando el medio de cultivo presentó un pH de 9,0 (Tabla 3).

La mayoría de los rizobios crecen en valores de pH cercanos a la neutralidad (16, 17). Sin embargo, se ha demostrado que algunas cepas de esta familia pueden tolerar rangos desde 3,5 hasta 9 (18).

Los aislados R1, R2 y R3 fueron capaces de crecer a pH 5,5 y también a valores de 8,5; lo que sugiere la presencia de mecanismos de adaptación que le permiten sobrevivir en estas condiciones (19), aspecto que constituye una ventaja para el uso en la práctica de este microorganismo como principio activo de un biofertilizante para beneficiar al cultivo del garbanzo, ya que, de mantenerse su efecto estimulador del crecimiento en las diferentes condiciones de acidez, podría utilizarse en distintos tipos de suelo y en diferentes agroecosistemas. Una posible explicación de la tolerancia a la acidez o alcalinidad se basa en la capacidad del microsimbionte para mantener el pH interno cerca de la neutralidad, lo que podría estar relacionado con la exclusión de protones, el aumento en la capacidad del

tampón citoplasmático o el mantenimiento de altas concentraciones de potasio y glutamato (20).

Ninguno de los 11 aislados creció a 25 y 27 °C, ni tampoco a 40 °C. Sin embargo, a partir de 30 °C y hasta 35 °C, se desarrollaron bien todos los microorganismos y entre 28 y 36 °C crecieron entre el 63 y el 82 % de los aislados, lo que pudiera estar relacionado con su procedencia de plantas cultivadas en las condiciones edafoclimáticas de Cuba, donde la temperatura oscila entre 28 y 35 °C. Se destacaron los aislados R1, R2 y R3 por su crecimiento a altas temperaturas, ya que toleraron rangos desde 29 hasta 38 °C y, particularmente R3, único aislado que creció a los 39 °C de temperatura (Tabla 4).

Según varios autores, los rizobios pueden crecer a temperaturas entre 28-30 °C (19). Otras investigaciones han arrojado resultados similares a los alcanzados en el presente estudio, e incluso superiores, donde aislados de nódulos de *Vigna unguiculata* toleraron hasta 45 °C (18), resultados que sugieren una adaptación a las altas temperaturas características de las áreas de procedencia.

La tolerancia de algunas cepas a diferentes pH y temperaturas puede favorecer su multiplicación en la rizosfera y contribuir a una mayor colonización de la especie, y con ello, a su éxito como bacteria promotora del

**Tabla 3.** Crecimiento de posibles rizobios, aislados de plantas de garbanzo, en diferentes niveles de pH

Aislados	Valores de pH														
	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	
R1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R1N	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
R8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
R9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
R13	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
R17	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
R19	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
R27	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
R29	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Crecimiento (+) ausencia de crecimiento (-)

**Tabla 4.** Crecimiento de posibles rizobios, aislados de plantas de garbanzo, en diferentes valores de temperatura

Aislados	Temperatura (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
R1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
R3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R1N	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
R8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
R9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
R13	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
R17	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
R19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
R27	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
R29	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Crecimiento (+) ausencia de crecimiento (-)



crecimiento vegetal. Referente a ello, autores como (21, 22) señalaron que estos factores de supervivencia, persistencia y competitividad, le confieren a los rizobios mayores posibilidades de sobrevivir y competir con otras bacterias del suelo, lo que favorece la colonización de las raíces de las leguminosas y la fijación de nitrógeno atmosférico.

## CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 63 aislados bacterianos a partir de siete variedades de garbanzo sembradas en cuatro tipos de suelos. De ellos se seleccionaron 11 como posibles rizobios por sus características morfo-fisiológicas y bioquímicas.
- Los aislados R1, R2 y R3 mostraron características morfológicas, tintoriales y fisiológicas, comunes a las descritas para los rizobios, así como una mayor tolerancia a las condiciones de pH y temperatura estudiadas, por lo que constituyen microorganismos promisorios como principios activos de nuevos inoculantes para beneficiar el cultivo del garbanzo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Apáez Barrios M, Escalante Estrada JAS, Apáez Barrios P, Álvarez Hernández JC, Apáez Barrios M, Escalante Estrada JAS, *et al.* Producción, crecimiento y calidad nutricional del garbanzo en función del nitrógeno y fósforo. *Revista mexicana de Ciencias agrícolas* [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 1];11(6):1273-84. doi:10.29312/remexca.v11i6.2226
2. Zhang J, Peng S, Shang Y, Brunel B, Li S, Zhao Y, *et al.* Genomic diversity of chickpea-nodulating rhizobia in Ningxia (north central China) and gene flow within symbiotic *Mesorhizobium muleiense* populations. *Systematic and Applied Microbiology* [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 1];43(4):126089. doi:10.1016/j.syapm.2020.126089
3. Rocha JFL de la, Sánchez DMS, Cortez JAJ. Efecto de la fertilización nitrogenada y fechas de siembra en el cultivo de garbanzo (*Cicer Arietinum* L.) en Tehuacán, Puebla, México (Original). *Roca. Revista científico-educacional de la provincia Granma* [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 1];15(3):25-34. Available from: <https://revistas.udg.co.cu/index.php/roca/article/view/925>
4. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria [Internet]. . International Biological Programme. London; 1970. 164 p. Available from: <https://www.amazon.com/manual-practical-root-nodule-bacteria-handbook/dp/0632064102>
5. Madigan M, Bender K, Buckley D, Sattley W, Stahl D. *Brock Biology of Microorganisms* [Internet]. NY, U.S.A.; 2017. 1056 p. Available from: <https://www.amazon.com/Brock-Biology-Microorganisms-Michael-Madigan/dp/0134261925>
6. Thies JE, Singleton PW, Bohlool BB. Modeling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 1991;57(1):29-37. doi:10.1128/aem.57.1.29-37.1991
7. Harrigan WF, McCance ME. *Métodos de laboratorio en microbiología* [Internet]. España: Academia; 1968. 426 p. Available from: <https://biblioteca.epn.edu.ec/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=39933>
8. Ortega-García M, Ríos-Rocafull Y, Zelaya-Molina L, Lara-Aguilera J, Arteaga-Garibay R, Nápoles-García MC. *Rhizobium pusense* associated to chickpea (*Cicer arietinum* L.), in Cuba. *Agronomía Mesoamericana* [Internet]. 2024 [cited 2024 Feb 6];55876-55876. doi:10.15517/am.2024.55876
9. Aroche EJA, Reina EM, Llanes JM. Diagnóstico inicial de la evolución de un suelo degradado. *Avances* [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 6];21(1). Available from: <https://www.redalyc.org/journal/6378/637869112010/html/>
10. Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena M-H, Rivas R, Martínez-Molina E. Current Status of the Taxonomy of Bacteria Able to Establish Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis. In: Zaidi A, Khan MS, Musarrat J, editors. *Microbes for Legume Improvement* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2024 Feb 6]. p. 1-43. doi:10.1007/978-3-319-59174-2\_1
11. Egamberdieva D, Wirth SJ, Shurigin VV, Hashem A, Abd\_Allah EF. Endophytic Bacteria Improve Plant Growth, Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Induce Suppression of Root Rot Caused by *Fusarium solani* under Salt Stress. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 6];8:1887. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01887>
12. Sahgal M, Jaggi V. Rhizobia: Culture Collections, Identification, and Methods of Preservation. In: Sharma SK, Varma A, editors. *Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2024 Feb 6]. p. 175-97. (Soil Biology). doi:10.1007/978-3-319-96971-8\_6
13. American Society for Microbiology., Microbiology AS for, Bergey DH, Breed RS. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [Internet]. 7th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co; 1957. 1130 p. doi:10.5962/bhl.title.10728
14. Singha B, Mazumder PB, Pandey P. Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobia from Root Nodule of Two Legume Species Cultivated in Assam, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 6];88(3):1007-16. doi:10.1007/s40011-016-0836-6
15. Ojuederie OB, Olanrewaju OS, Babalola OO. Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: Implications for Sustainable Agriculture. *Agronomy* [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 6];9(11):712. doi:10.3390/agronomy9110712
16. Andrews M, Andrews ME. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2017;18(4):705. doi:10.3390/ijms18040705
17. Hussain HA, Hussain S, Khaliq A, Ashraf U, Anjum SA, Men S, *et al.* Chilling and Drought Stresses in Crop Plants: Implications, Cross Talk, and Potential Management

- Opportunities. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 6];9:1-21. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2018.00393>
18. Padilla EG, Ruiz-Díez B, Fajardo S, Eichler-Loebermann B, Samson R, Damme PV, *et al.* Caracterización de rizobios aislados de nódulos de frijol caupí, en suelos salinos de Cuba. *Cultivos Tropicales* [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 6];38(4):39-49. Available from: <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1401>
  19. Rodiño AP, Riveiro M, De Ron AM. Implications of the Symbiotic Nitrogen Fixation in Common Bean under Seasonal Water Stress. *Agronomy* [Internet]. 2021 [cited 2024 Feb 6];11(1):70. doi:10.3390/agronomy11010070
  20. Dhull S, Gera R, Sheoran HS, Kakar R. Phosphate Solubilization Activity of Rhizobial Strains Isolated From Root Nodule of Cluster Bean Plant Native to Indian Soils. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 6];7(04):255-66. doi:10.20546/ijcmas.2018.704.029
  21. Velazquez E, Carro L, Flores-Felix JD, Menendez E, Ramirez-Bahena MH, Peix A. Bacteria-inducing legume nodules involved in the improvement of plant growth, health and nutrition. *Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities*. 2019 [cited 2024 Feb 6]; doi:10.1007/978-981-13-8495-0\_4
  22. Lebrazi S, Fadil M, Chraibi M, Fikri-Benbrahim K. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 6];18(1):21. doi:10.1186/s43141-020-00035-9