

Caracterización

morfológica y bioquímica de cepas nativas de *Rhizobium spp* en la habichuela (*Vigna unguiculata*. l. var. Cantón -1), cultivada en el organopónico Cuatro Caminos, Cienfuegos

Morphological and Biochemistry characterization of native strains of Rhizobium spp in the common bean (Vigna unguiculata. l. var. Canton -1), cultivated in Cuatro Caminos organoponic farm, Cienfuegos

Orlando Gualberto Rodríguez del Rey Piña^{1*}

E-mail : ogrodriguez@ucf.edu.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6895-4458>

Enrique Parets Selva¹

E-mail: eparets@ucf.edu.cu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2960-023X>

Juana Arelis Díaz Jáuregui²

E-mail: adiasja@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0277-2340>

Yoandris Socarrás Armenteros¹

E-mail: ysocarras.1984@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-08374-0685>

Cristian Alejandro Acosta Hirola¹

E-mail: cahirola@ucf.edu.cu

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8856-1691>

¹Universidad de Cienfuegos "Carlos Rafael Rodríguez". Cienfuegos. Cuba.

² Universidad de Ciencias Médicas. Cienfuegos. Cuba.

*Autor para correspondencia

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Rodríguez del Rey Piña, O. G., Parets Selva, E., Díaz Jáuregui, J. A., Socarrás Armenteros, Y. y Acosta Hirola, C. A. (2026). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas nativas de *Rhizobium spp* en la habichuela (*Vigna unguiculata*. l. var. Cantón -1), cultivada en el organopónico Cuatro Caminos, Cienfuegos. *Revista Científica Agroecosistemas*, 14, e816. <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/816>

RESUMEN

La habichuela (*Vigna unguiculata* L.), es un cultivo de importancia global para la seguridad alimentaria de muchos países. Estas plantas establecen simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Los objetivos principales de este trabajo fueron caracterizar y aislar cepas nativas de *Rhizobium*, a partir de los nódulos presentes en la raíz. El área de estudio estuvo ubicada en el organopónico de la Universidad de Cienfuegos, efectuándose una investigación experimental. Primeramente, se extrajeron los nódulos, se lavaron, desinfectaron, conservaron, y maceraron. Se hicieron diluciones seriadas, transfiriendo un volumen de las últimas tres diluciones hacia placas Petri con medio de cultivo YEMA, incubándose a 28 °C. Las características macroscópicas de las colonias observadas, se corresponden con el género *Rhizobium* y son generalmente de crecimiento rápido, ligeramente rosadas, circulares, y convexas. La caracterización microscópica se realizó mediante la Tinción de Gram, anotando que son bacterias Gramnegativas de forma bacilar. Después de realizar las pruebas fisiológicas - bioquímicas y las comparaciones con estudios anteriores, son concluyentes para afirmar que se ha logrado obtener una cepa nueva de *Rhizobium spp*, específica de la habichuela (*Vigna unguiculata* L. Var. Cantón -19). Se trata de un producto biotecnológico con marcado valor agroecológico como biofertilizante para aplicarlo a nivel territorial en las áreas agrícolas de la provincia. Este resultado resulta novedoso, por su impacto en las Ciencias agropecuarias y en el área del conocimiento científico actual.

Palabras clave:

Agroecológico, Bacteria, Leguminosas, Simbiosis.

ABSTRACT

The common bean (*Vigna unguiculata* L.), is a globally important crop for food security in many countries. These plants establish a symbiotic relationship with bacteria of the genus *Rhizobium spp*. The main objectives of this work were to characterize and isolate native strains of *Rhizobium spp*. from the nodules present on the root. The study area was located in the organoponic garden of the University of Cienfuegos, where an experimental investigation was carried out. First, the nodules were extracted, washed, disinfected, preserved, and macerated. Serial dilutions were made, transferring a volume of the last three dilutions to Petri dishes with YEMA culture medium, incubated at 28 °C. Then, the macroscopic characteristics of the colonies were determined. These colonies correspond to the genus *Rhizobium spp*. and are generally fast-growing, slightly pink, circular, and convex. Microscopic characterization was performed using Gram staining, revealing the presence of Gram-negative, rod-shaped bacteria. After conducting physiological and biochemical tests and comparing the results with previous studies, it is conclusive that a new strain of *Rhizobium spp.*, specific to common bean (*Vigna unguiculata* L. var. Cantón -19), has been obtained. This biotechnological product has significant agroecological value and is intended for application in the agricultural areas of the province. This result is novel due to its impact on agricultural sciences and current scientific knowledge.

Keywords:

Agroecological, Bacteria, Leguminous, Symbiosis.

INTRODUCCIÓN

La historia de la fijación simbiótica, se contempla como un proceso fundamental en el ciclo del nitrógeno y en la ecología de los ecosistemas terrestres, se remonta a investigaciones científicas que datan de finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Este fenómeno, que implica la relación simbiótica entre ciertas plantas, principalmente leguminosas, y bacterias del género *Rhizobium spp.*, ha sido objeto de estudio por muchos investigadores, quienes demostraron que las leguminosas eran capaces de fijar nitrógeno atmosférico gracias a la acción de bacterias presentes en sus raíces. Este descubrimiento sentó las bases para posteriores investigaciones sobre la simbiosis entre plantas y los microorganismos (Ramírez-Bahena et al., (2016).

A lo largo del siglo XX, se realizaron numerosos estudios que ampliaron el conocimiento sobre los mecanismos bioquímicos y genéticos involucrados en este proceso. Investigaciones más recientes han permitido identificar genes específicos responsables de la formación de nódulos en las raíces y la fijación de nitrógeno, así como el papel crucial que juegan otros organismos en esta relación simbiótica. Las Rizobacterias, son promotoras del crecimiento en plantas, e incluye el género *Rhizobium spp.* Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. Tratando-se de bacterias promotoras do crescimento de plantas, testes para avaliar cada mecanismo podem ser realizados *in vitro*, como a produção de compostos indólicos e sideróforos, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e supressão de patógenos vegetais. Estos microorganismos producen la estimulación indirecta del crecimiento de las plantas, con una amplia variedad de mecanismos, por los cuales la bacteria inhibe la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Oldroyd et al., 2008).

Entre las características principales de *Rhizobium*, se encuentran, que son bacterias Gramnegativas, con dimensiones entre 0.5-0.9 x 1.2-3.0 µm, aerobias, y bacilares, con dos capas de pared celular (la primera capa está compuesta por carbohidratos y proteínas, y la segunda por lípidos y carbohidratos). Estas bacterias son conocidas principalmente por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con plantas leguminosas. La simbiosis entre *Rhizobium spp.*, las leguminosas se forma cuando las bacterias colonizan las raíces, formando estructuras especializadas llamadas nódulos radiculares. Dentro de estos nódulos, *Rhizobium spp.*, convierte el nitrógeno del aire en amoníaco, que la planta puede utilizar para su crecimiento. En el contexto global, *Rhizobium spp.*, contribuye a la sostenibilidad agrícola al mejorar la salud del suelo y aumentar la producción de cultivos, lo que es especialmente relevante en regiones donde los recursos son limitados. Además, su uso promueve prácticas agrícolas más ecológicas y sostenibles, ayudando a mitigar el cambio climático, al conseguir una gestión más eficiente del nitrógeno (Erisman, 2011).

En Cuba, el empleo de *Rhizobium spp.*, desempeña un papel importante en la agricultura, especialmente en la producción de leguminosas, que son fundamentales para la dieta y la economía del país. La fijación biológica de

nitrógeno por estas bacterias es particularmente valiosa en un contexto donde la sostenibilidad y la reducción de insumos químicos son prioritarias para la nación, en tiempos cuando escasean los fertilizantes químicos, y el riesgo que entraña su uso continuado para el medio ambiente. Las condiciones climáticas de Cuba, favorecen el crecimiento de diversas especies de leguminosas, y la investigación, se ha enfocado en optimizar el uso de *Rhizobium spp.*, para mejorar la productividad agrícola. Los agricultores cubanos han comenzado a adoptar prácticas agroecológicas que incluyen la inoculación de semillas con cepas de *Rhizobium spp.*, lo que ayuda a incrementar los rendimientos de cultivos. Además, el uso de leguminosas en sistemas de rotación de cultivos, contribuye a la mejora de la calidad del suelo y al aumento de su fertilidad, lo que es esencial para el desarrollo sostenible en la isla.

Las Investigaciones y proyectos en la región, realizadas por Guianeya Pérez et al. (2008), han promovido la inoculación de semillas con cepas específicas nativas de *Rhizobium spp.*, para optimizar el rendimiento de los cultivos. Además, se han explorado prácticas agroecológicas que integran el uso de leguminosas en sistemas de rotación, lo que ayuda a mantener la salud del suelo y reducir la erosión. Haciendo énfasis, que esta bacteria es fundamental en la naturaleza del suelo por su simbiosis con leguminosas, mejorando la fertilidad mediante la fijación de nitrógeno. Otros autores como Sai et al. (2025), señalan que la ingeniería genética de *Rhizobium spp.*, presenta un camino prometedor para la agricultura sostenible, ya que las cepas modificadas pueden aumentar la producción agrícola, mejorar la salud del suelo y reducir la dependencia de fertilizantes químicos. Además, investigan los mecanismos moleculares que permiten a *Rhizobium spp.*, mitigar el estrés ambiental como la salinidad y la sequía

En Cienfuegos, la producción y aplicación de *Rhizobium spp.*, pudiera desempeñar un papel valioso en la agricultura local, especialmente en la producción de leguminosas. Esta simbiosis con leguminosas no solo enriquece el suelo, sino que también contribuye a un aumento del rendimiento agrícola y a la sostenibilidad de los cultivos. Por lo que los objetivos de este trabajo fueron: Seleccionar las plantas de habichuela (*Vigna unguiculata L.var. Cantón -1*), en el área de estudio, Separar los nódulos de la raíz de la habichuela (*Vigna unguiculata L.var. Cantón -1*), e Identificar las cepas nativas de *Rhizobium spp.*, presentes en los nódulos de la habichuela (*Vigna unguiculata L.var. Cantón -1*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El escenario de estudio estuvo ubicado en la carretera de Rodas, en la entrada de la Universidad de Cienfuegos (Figura 1). Limita al norte con un asentamiento poblacional, al sur con las instalaciones de la misma Universidad, al oeste con un asentamiento poblacional y al este con la carretera que conduce a Rodas. Destacando que se ubica en un área de gran afluencia de tráfico vehicular, y zona impactada por varias industrias. El estudio se realizó en el periodo comprendido entre enero de 2024, y marzo de 2025, efectuándose una investigación de tipo Experimental. Utilizando como planta hospedera de *Rhizobium spp.*, la habichuela (*Vigna unguiculata L.var. Cantón -1*).

Muestreo y procesamiento de los nódulos

Primeramente se seleccionaron las plantas más vigorosas con mayor número de vainas, de forma aleatoria, en tres puntos diferentes, humedeciendo previamente el suelo para no romper la nodulación presente en las raíces. Se tomaron todos los nódulos que crecieron formando una masa de aspecto tumoral, adheridos a la raíz de la planta. Se escogieron aquellos de mayor tamaño y de color marrón. La desinfección de los nódulos, se realizó según la metodología sugerida por Somasegaran y Hoben (1994). Todos los nódulos seleccionados previamente, fueron colocados en un beaker estéril para efectuar el macerado. Para realizar las diluciones seriadas y determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se escogió la metodología descrita por Bashan et al. (2023) y Maheshwari et al. (2025).

Aislamiento de microorganismos de los nódulos de la leguminosa

El medio de cultivo empleado fue el Extracto de Levadura-Manitol-Agar con Rojo Congo (Medio YEMA), que presenta los siguientes componentes químicos:

Hydrogenofosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4): 0,5 g/L

Sulfato de magnesio pentahidratado ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$): 0,2 g/L

Cloruro de sodio (NaCl): 0,1 g/L

Manitol: 10 g/L

Extracto de levadura: 0,4-10 g/L

Rojo Congo: 0,025 g/L

Cicloheximida: 0,5 mL

Agar: 15-20 g/L

pH: 6,8 -7,0

Agua destilada: 1000 mL

Este medio de cultivo fue propuesto por Sánchez et al. (2022); Mondal et al. (2024), y Gebre, (2025). Al mismo, se le añadió también cicloheximida para inhibir el crecimiento fúngico, según la técnica propuesta por Vicent (1975). Se distribuyó el medio de cultivo en placas Petri, en una proporción de volumen entre 20-25 ml de medio de cultivo por placa, las cuales se esterilizaron en autoclave por 20 minutos, a 120 °C, y 1, 5 atmósfera. La adición del colorante Rojo congo, se utilizó para descartar las colonias contaminantes por diferencia de color. La temperatura de incubación fue de 28 °C, entre 24 y 48 horas.

Descripción microscópica y macroscópica de las cepas aisladas

Las características culturales de las colonias, que crecieron en las últimas tres diluciones (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) en las placas Petri, fueron comparadas con las ilustraciones del Manual Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/FAO (FAO, 1985). A las colonias típicas (cinco colonias por placas), se le practicó la Tinción de Gram

(Brock, 2003). El tipo microscopio utilizado fue el estereoscópico y óptico, marca Olympus, con objetivos 10x, 20x, 40x y 100x. Comparando las características de las colonias de interés, específicas de *Rhizobium*, que se caracterizan por ser de tamaño mediano, forma circular, borde uniforme, elevación convexa, superficie lisa, consistencia mucoides, y color blanco-rosadas.

Caracterización fisiológica y bioquímica de las cepas rizobianas

Posteriormente se evaluó por duplicado la respuesta fisiológica y bioquímica de la cepa, enfrentándola a diferentes condiciones de laboratorio y sustratos orgánicos, siguiendo las referencias del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987), y el Manual de Bergey 'S' (2001.p 335.). Entre las características fisiológicas y bioquímicas verificadas se encontraron: pH, temperatura, condiciones de salinidad, tolerancia a los metales, sensibilidad a los antibióticos, utilización de la glucosa, lactosa, citrato como fuente de carbono, Indol, y la presencia de las enzimas nitrato reductasa, oxidasa, catalasa, así como la prueba de oxidación-fermentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La elección del área de estudio en el Organopónico Cuatro Caminos, Cienfuegos, fue de interés inicial, ya que es administrada por la Universidad de Cienfuegos, declarada recientemente Unidad Docente. Esto facilita el acceso de los estudiantes y profesores relacionados con sus investigaciones (Figura .1). También esta área es favorecida ecológicamente por su clima tropical y rica biodiversidad, lo cual facilita el desarrollo de la agricultura tropical. Por otra parte la ubicación geográfica del organopónico en una zona urbana, crea una conexión entre la producción agrícola y el consumo local, promoviendo la seguridad alimentaria y la sostenibilidad. Las muestras se tomaron entre los meses de octubre de 2024 y marzo del 2025, coincidiendo con el periodo de cultivo de la habichuela (*Vigna unguiculata* L.var. *Cantón -1*) en Cuba (Figura .2).

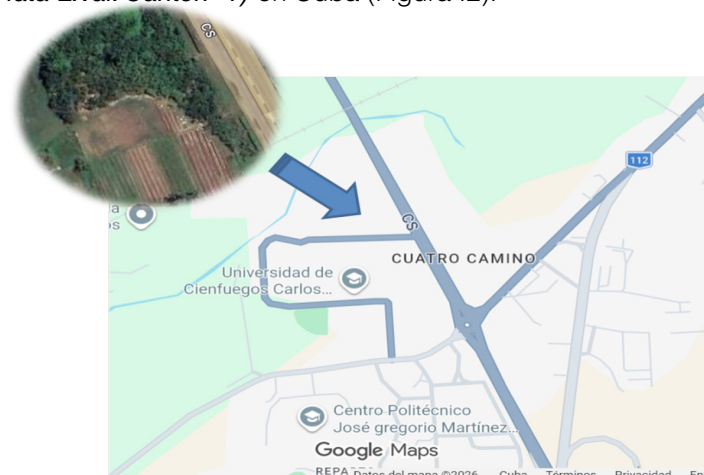


Fig. 1: Ubicación geoespacial del organopónico Cuatro Caminos en la Provincia de Cienfuegos.

Fuente: Elaborado a partir de imagen satelital, obtenida de Google Maps.



Fig. 2: Planta de habichuela (*Vigna unguiculata* L. var. Cantón -1).

El peso promedio de los nódulos por vainas estuvo en el rango de 1 g, coincidiendo con esto, los estudios realizados por Graham et al. (2000), se refieren a que los pesos promedios de los nódulos con mejores características para aislar *Rhizobium spp* presentes en el interior de los nódulos, se encuentran en el rango entre 0,1 y 1,5 gramos, que pudieran variar en dependencia de las cepas de *Rhizobium spp*, condiciones del suelo, estado de desarrollo de la planta, y otros factores ambientales. En esta misma línea Contreras et al. (2007), siguieron un método similar para la selección y análisis de los nódulos, escogieron aquellos nódulos que presentaron forma esférica y coloración interna roja-marrón (Figura .3).

La desinfección de los nódulos, sumergidos en alcohol al 70 % durante un minuto e hipoclorito de sodio al 2% por cuatro minutos, es un paso importante con el fin de eliminar la contaminación por cualquier otro tipo de microorganismo del suelo, diferente a los géneros bacterianos de interés en el estudio. Al mismo tiempo la conservación de los nódulos en cloruro de calcio (CaCl_2), y su posterior conservación a 8 °C, evita su deterioro físico, garantizando que las bacterias presentes en su interior estén biológicamente activas. La maceración, consigue triturar el material biológico donde se encuentra adherida la bacteria, como resultado, los *Rizobios* quedan libres en el medio acuoso, y pueden entonces ser fácilmente traspasados hacia los medios de cultivos en forma de inóculos o también hacia

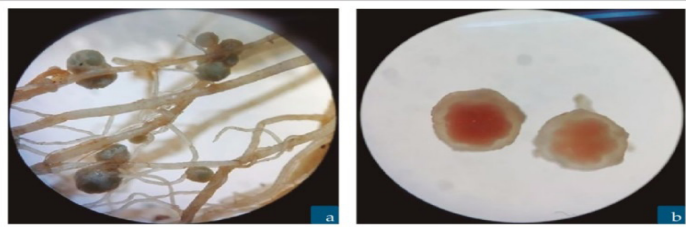


Fig.3: a) Nódulos adheridos a la raíz de la habichuela (*Vigna unguiculata* L. var. Cantón -1); b) Corte trasversal de los nódulos de color marrón.

Fuente: Tomado de: <http://www.google.com>

La observación microscópica en fresco del macerado o pool de los nódulos, posibilita obtener un criterio presuntivo de la población microbiana interna dentro del nódulo, sugestiva de presentar mayoritariamente bacterias móviles de morfología bacilar. En este caso se observaron un número importante de células bacterianas con movimiento activo flagelar. En la preparación en fresco (Figura. 4), se observa una imagen de las bacterias en movimiento dentro

del nódulo. Similares observaciones fueron documentadas por González et al. (2018), cuando explican que la movilidad de *Rhizobium spp* dentro del nódulo es un procedimiento técnico microbiológico muy esclarecedor para evidenciar la composición biológica interna del nódulo. Este resultado resulta valioso, dado que se parte de una concentración elevada de bacterias, lo cual sugiere, que se está trabajando con la bacteria del género *Rhizobium spp*. Resultado que guarda relación con las características morfológicas y motilidad, descritas en el Manual Bergey' S, (2001).

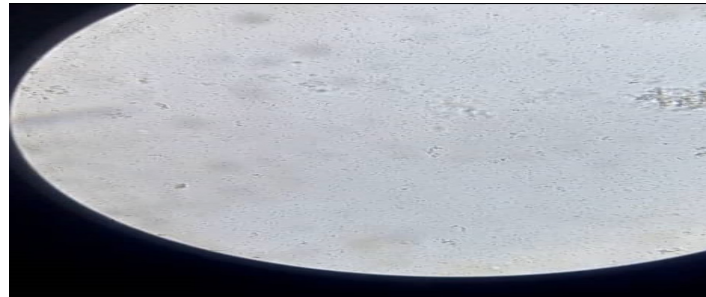


Fig.4: Preparación en fresco de la muestra interna de los nódulos.

A partir del macerado preparado anteriormente, se escogió el método de las diluciones seriadas, para observar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), (Figura. 5). Se contaron el número de colonias típicas de *Rhizobium spp* que crecieron aisladas en las placas Petri de las últimas tres diluciones (10^{-7} , 10^{-8} , y 10^{-9}), y se multiplicaron por la dilución correspondiente, obteniendo las Unidades Formadoras de Colonias por mililitros (UFC/mL). Para evitar confusiones, se añadió Rojo Congo al Medio YEMA, dado que las cepas *Rhizobium spp*, absorben débilmente este colorante formando colonias blancas o rosadas, mientras que otras bacterias del suelo forman colonias rojas o naranjas intensas. Después las placas con crecimiento se conservaron en Medio YEMA, y tubos en plano inclinado, entre 4 °C- 8 °C, para posteriores estudios.

El Medio YEMA es el más utilizado para obtener buen crecimiento de cepas bacterianas de *Rhizobium spp*. Este medio es recomendado por el Manual Técnico de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno- Leguminosa *Rhizobium spp* (FAO, 1985), al que se le añade también cicloheximida para inhibir el crecimiento fúngico, que ocasionalmente pudiera aparecer tras la incubación, según la técnica propuesta por Vicent (1975).

Por su parte Bequer et al. (2000), le confieren mucha importancia al Medio YEMA, el cual resulta apropiado para el aislamiento selectivo de cepas nativas de *Rhizobium spp*. Se trata de un medio de cultivo que utiliza sales como fuentes de nutrientes minerales, tales como el sulfato de magnesio, cloruro sodio y sulfato de potasio, que la bacteria utiliza como intercambiador iónico en la transferencia de electrones en los procesos metabólicos. Igualmente se utiliza el extracto de levadura como fuente de nitrógeno y vitaminas que la bacteria precisa de ellos y por último el manitol, que es la fuente de carbono principal. Por su parte

el pH, se ajusta entre 6,8 -7,0, siendo variable para algunas cepas. Al igual ocurre con la temperatura que la bacteria puede utilizar, desde los 28 grados centígrados, hasta los 37 °C. A este medio de cultivo, también se le añade agar en una proporción de: 15-20 g/L, para regular la difusión de los nutrientes e identificar las colonias por aislamiento unas de otras.

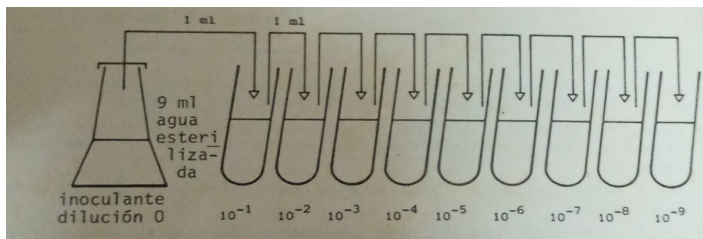


Figura .5: Método de las diluciones seriadas

Fuente: <http://www.google.com.cu>

En las placas cultivadas y posteriormente incubadas a 28 °C, entre 24 y 48 h (Figura. 6), hubo crecimiento rápido a las 48 horas. Posteriormente se analizó el tipo de colonia, y sus características macroscópicas, observando que son blancas o ligeramente rosadas, circulares, convexas y de aspecto traslúcido, que guardan relación con las características culturales reportadas para el género *Rhizobium spp.* (Manual Técnico para Fijación Simbiótica *Rhizobium / Leguminosa* (FAO, 1985) y Manual de Bergey 'S 2001.

Estos resultados concuerdan con los trabajos realizados por Martínez Viera (1986), donde describe a las colonias de *Rhizobium spp.*, de acuerdo a su diámetro, circulares, convexas, de color blancas o rosadas, con elevación y consistencia mixoides, calificándolas de rápido crecimiento aquellas colonias formadas durante las primeras 48 horas de incubación, y de lento crecimiento aquellas que aparecen en el medio de cultivo durante los 3 a 7 días. Aunque en ocasiones son variables en cuanto al color en un mismo medio de cultivo, dependiendo de las condiciones ambientales, sin embargo esta característica no fue observada en la presente investigación.

También fueron observadas en algunas placas de Petri colonias con colores diferentes, debido a la contaminación con bacterias del suelo, estas colonias por tanto fueron descartadas, porque no son de interés para el estudio de aislamiento de cepas con capacidad para fijar el nitrógeno en simbiosis con la habichuela (*Vigna unguiculata L.var. Cantón -1*). Coincidiendo con esto, Paudyal et al. (2021) describen que las colonias auténticas de *Rhizobium spp* se caracterizan por no absorber el rojo Congo, apareciendo como colonias de color blanco traslúcido, mientras que la mayoría de las bacterias contaminantes del suelo sí lo absorben y tornan sus colonias de color rojo o naranja. Este criterio visual permite, por tanto, una primera y rápida selección en placa, permitiendo descartar colonias no deseadas de manera temprana y eficiente durante el proceso de aislamiento.



Figura .6: Placa de Petri con crecimiento de la bacteria *Rhizobium spp* en Medio YEMA.

En la Figura. 7, aparece una imagen de la Tinción de Gram (Brock, 2003) practicada a una de las cinco colonias típicas seleccionadas del Medio YEMA, a partir de la última dilución (10^{-9}), como resultado se observan bacilos Gramnegativos, morfológicamente cortos y largos, algunos individuales o en pareja. Resultado que guarda relación con los estudios realizados por Abril (2022) y Casasola Bado (2022), quienes señalan que esta tinción se utiliza sistemáticamente en la fase inicial de caracterización de aislados bacterianos de *Rhizobium spp*, obtenidos de nódulos radiculares, y que la morfología pudiera variar de acuerdo al desarrollo de la bacteria en el suelo y dentro del nódulo, anotando que generalmente, se destacan bacilos cortos y largos, individuales o en parejas.

De igual forma Llop et al.(2001), sostienen que esta tinción es muy usada en los laboratorios de microbiología, donde se investigan nuevas cepas de bacterias para poder aislarlas y clasificarlas, ya que ofrece la posibilidad de determinar, tanto la pureza del cultivo, como anotar las características morfológicas de la bacteria (tamaño, forma, agrupación, y concentración por campo de observación).

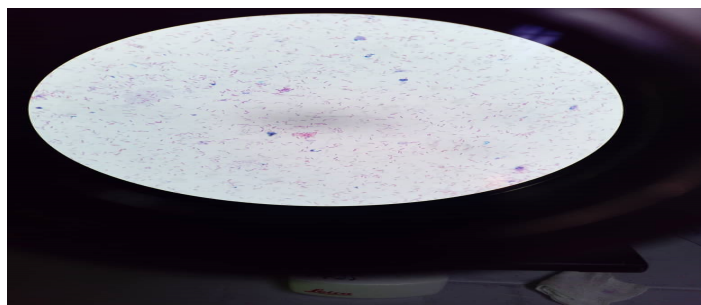


Fig. 7: Tinción de Gram para la determinación de las características morfológicas de *Rhizobium spp*.

Tabla 1. Resultados de las Pruebas Fisiológicas – Bioquímicas practicadas a la bacteria *Rhizobium spp.*

Parámetros Fisiológicos- Bioquímicos	Reacción esperada (+), (-), (±)	Resultados mostrados por la cepa en estudio
pH	4,0 -10,0	8,5
Temperatura	4°C -40°C	28 °C
Salinidad	Crecimiento en NaCl	+
Metales	Crecimiento en MgSO ₄	+
Estreptomina	± (S/R)	(S/R) ±
Ampicillin	R	R
Glucosa	+	+
Lactosa	-	-
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Ureasa	+	+
Nitrato reductasa	+	+
Indol	+	+
Citrato	+	+
Oxidación –Fermentación	+	+

Leyenda: Respuesta variable (±), respuesta positiva (+), respuesta negativa (-), S: sensible al antibiótico, R: resistente al antibiótico.

En la Tabla 1, aparecen los resultados comparativos de la nueva cepa aislada, y su respuesta a los diferentes parámetros de crecimiento y sustratos orgánicos. En el presente estudio el pH del suelo fue de 7,5, y el pH ajustado para el medio de cultivo 8,5, ambos se encuentran dentro del rango de pH (4,0 -10,0), establecido en el Manual de Bergey 'S, (2001, p 335). Este es un factor que afecta el crecimiento, ya que el pH, influye en la carga iónica y en el comportamiento anfótero de las proteínas, también sus funciones en el citoplasma bacteriano, por lo que la acidez del suelo, debe controlarse. Coincidiendo con lo anterior Fernández(2003), estudió el amplio rango de crecimiento de estas bacterias , con valores de pH, que oscilan entre 5.4 - 8.0. Destacando que el pH del suelo para el aislamiento de *Rhizobium spp* debe tenerse en cuenta ya que afecta la simbiosis, multiplicación y la supervivencia de la bacteria, también limita la fijación del N₂, e indirectamente genera toxicidades o deficiencias de otros nutrientes.

En el caso del factor temperatura, la cepa en estudio creció a 28 °C, en el rango establecido entre 4°C y 40°C, ello sugiere que las bacterias del género *Rhizobium spp* pueden crecer en un amplio rango de temperaturas . En esta misma línea Bequer et al. (2000), evaluaron la respuesta del crecimiento de *Rhizobium spp* a diferentes valores de temperaturas, y encontraron resultados, donde la bacteria se comporta como mesófila, con una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 25 °C y 31 °C.

La bacteria en estudio, creció bien cuando se expuso a una concentración de sal (NaCl), de 0,1 g /L. Justamente

la presencia de iones sodio y potasio son necesarios para la polarización de la membrana de la bacteria y su selectividad al transporte de sustancias hacia el interior celular. En este sentido, estudios realizados por Contreras et al. (2007), utilizando el cloruro de sodio al 0,1-1 %, observaron que las cepas presentaron buen crecimiento.

En cuanto a la tolerancia a metales , cuando la bacteria se expuso a una concentración de 0,2 g/L de sulfato de magnesio, creció bien , ya que este elemento químico, es importante para la activación de las vías metabólicas , actuando como cofactor de muchas enzimas , como la hexoquinasa y las ATP asa , que son cruciales para la glucólisis , ciclo de Krebs y la transferencia de fosfatos a otras moléculas en el citoplasma de *Rhizobium spp*. En correspondencia con lo anterior Dong-Yeon et al. (2019), sostienen que este ion **proporciona estabilidad a los ribosomas bacterianos**, promoviendo su **supervivencia** frente a determinados **antibióticos**. Así pues, las bacterias con poco magnesio son inestables y susceptibles a morir cuando son atacadas por los antimicrobianos.

La nueva cepa mostró un resultado variable cuando se enfrentó a la estreptomina, y resistente al ampicillin, coincidiendo con el Manual de Bergey 'S (2001, p .335) para la clasificación de *Rhizobium spp*. Esta variabilidad de *Rhizobium spp*, respecto a la estreptomina y su resistencia a la ampicilina, se explican por mecanismos genéticos y fisiológicos distintos. Tal como indican los estudios de Ajayi et al. (2024), donde en el caso de la estreptomina, *Rhizobium spp* , muestra variabilidad, que depende del nivel de resistencia adquirida, provocada por mutaciones que le confieren a la bacteria alto nivel de resistencia, alterando la estructura ribosomal, lo cual impide la unión del antibiótico a su sitio celular , mientras que la resistencia de bajo nivel se debe a una disminución de la permeabilidad de la membrana que reduce la acumulación del fármaco en el interior bacteriano. Por otro lado, la resistencia intrínseca a la ampicilina en Rizobacterias, está mediada por la acción combinada de una β-lactamasa (que hidroliza el antibiótico), y una transglicosilasa lítica, cuya expresión está regulada por una cascada de factores que controlan negativamente la expresión de la β-lactamasa.

Igualmente la bacteria aislada degrada la glucosa de forma rápida para obtener ATP, este compuesto orgánico es una fuente primaria de energía, un carbohidrato simple. Sin embargo frente a la lactosa, el resultado del crecimiento fue negativo, ya que es un disacárido estructuralmente más complejo y requiere la activación enzimática de los genes iniciales del operón lactosa. Coincidiendo con esto, Champaneria y Rajkumar (2022), observaron que, aunque las bacterias pueden utilizar ambos azúcares, la presencia de glucosa reprime el transporte y la metabolización de la lactosa hasta que la glucosa se agota en el medio. Este proceso está regulado por la disponibilidad de transportadores específicos y la actividad de enzimas como la hexoquinasa, priorizando así la fuente de carbono que requiere menos energía metabólica para su asimilación, en este caso la glucosa. Por consiguiente, la lactosa es utilizada únicamente cuando las bacterias ya han metabolizado la glucosa presente, lo que evidencia una jerarquía en el

consumo de carbono que maximiza la eficiencia energética de *Rhizobium spp*, en su entorno.

Respecto a la utilización de la urea y los nitratos como fuente de nitrógeno, la nueva cepa aislada de *Rhizobium spp*, mostró un resultado positivo, ya que posee la enzima ureasa, descomponiendo la urea en amoníaco y dióxido de carbono, y también la enzima nitrato reductasa, que reduce los nitratos (NO_3^-), en nitritos. Ambos compuestos, pasan a formar parte del suelo, y las plantas entonces los pueden utilizar para sintetizar sus proteínas y los ácidos nucleicos. En ese mismo orden de ideas Wei et al. (2022), demostraron que *Rhizobium spp*, puede utilizar eficientemente nitratos (NO_3^-), mediante un proceso de desnitrificación aeróbica. Estos autores identificaron que la bacteria posee genes funcionales, que le permite transformar el NO_3^- en NO_2^- y posteriormente en gases como N_2O y N_2 . En cuanto a la urea, las investigaciones de Pérez-Álvarez et al. (2024), afirman que la inoculación con *Rhizobium spp*, incrementa la actividad de la enzima reductasa de nitratos en las plantas, facilitando la asimilación de la urea, cuando esta se hidroliza en el suelo. En conjunto, estos estudios evidencian que, además de fijar nitrógeno atmosférico, *Rhizobium spp*, puede metabolizar nitratos mediante vías enzimáticas especializadas y beneficiarse indirectamente de la hidrólisis de la urea en su entorno.

De modo similar la nueva cepa de *Rhizobium spp*, aislada resultó positiva a la enzima catalasa y oxidasa, donde la enzima catalasa sintetizada por la bacteria, descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La oxidasa es una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular (O_2), como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H_2O), o a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Dentro de este marco Luo et al. (2020), señalan que la oxidasa y catalasa en *Rhizobium spp*, son esenciales para descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), protegiendo a la bacteria y a los nódulos de las leguminosas del estrés oxidativo, especialmente bajo condiciones de estrés salino.

Además la bacteria en estudio transforma el aminoácido Triptófano en Indol, un precursor de la auxina (Ácido indol-3-acético), que es la hormona de crecimiento de las plantas, ayudando a crear los nódulos donde viven en simbiosis con las leguminosas. Agregando a lo anterior Ma y Conway. (2025), señalan que si la bacteria produce mucha auxina, la planta puede estresarse, sin embargo estas mismas bacterias pueden reciclar la auxina. Por lo que en los últimos cinco años, se ha profundizado significativamente en cómo *Rhizobium spp*, y bacterias relacionadas utilizan el ácido indol-3-acético (AIA), para modular la simbiosis con leguminosas. Mostrando resultados muy alentadores en el campo de la ingeniería genética y balance hormonal, nuevos mecanismos moleculares, degradación y catabolismo, y en la detección de vías en *Bradyrhizobium* para sintetizar Ácido Indol acético a partir del triptófano, un paso crucial para la comunicación química con la planta huésped.

La utilización de citrato como única fuente de carbono para obtener la energía, está presente en la bacteria en estudio. Resultados que se corresponden con lo planteado por Pardo et al. (1994). Estos Investigadores señalan que, si

bien el citrato puede emplearse en combinación con otras fuentes de carbono, no era considerado una fuente óptima de forma aislada para el crecimiento de algunas cepas de *Rhizobium spp*, en estudios antiguos. Un hallazgo clave es la existencia de la enzima citrato sintasa, codificada en un gen específico del plásmido simbiótico de *Rhizobium tropici*, la cual resulta fundamental para una adecuada formación de nódulos, ya que la inactivación de este gen reduce la capacidad de nodulación en un 30-50%.

También la bacteria *Rhizobium spp*, presenta un metabolismo flexible que alterna entre estados oxidativos y fermentativos según la disponibilidad de oxígeno. Coincidiendo con esto Encarnación et al. (1995), demostraron que en cultivos en medio mínimo, *Rhizobium etli* disminuye la concentración de O_2 , lo que desencadena una respuesta fermentativa caracterizada por la excreción de ácidos orgánicos y aminoácidos, junto con la acumulación de poli- β -hidroxi-butarato (PHB). Este estado fermentativo está regulado por una señal de densidad celular que afecta las enzimas del ciclo de Krebs. En contraste, en condiciones oxidativas óptimas (20% de O_2), se mantiene el flujo de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), evitando la fermentación. Este comportamiento dual se asemeja al metabolismo que la bacteria expresa durante la simbiosis dentro de los nódulos.

Finalmente los estudios realizados por Gómez-Godínez et al. (2023), y Kang et al. (2023), describen la fisiología y el metabolismo de *Rhizobium spp*, como una bacteria que utiliza la glucosa como fuente de carbono y energía, ya que se trata de una bacteria heterótrofa, aerobia oxidante, oxidasa y catalasa positivas, también reduce los nitratos a nitritos, posee la enzima ureasa, y utiliza el Indol. Resultados similares son descritos por Kumar et al. (2023), cuando estudian y analizan la respuesta bioquímica de *Rhizobium spp*, a diferentes sustratos orgánicos. Paralelamente Chandrakanta et al. (2024), resaltan que las pruebas bioquímicas y fisiológicas son fundamentales para el aislamiento y caracterización de *Rhizobium spp*, ya que permiten seleccionar cepas nativas con alto potencial para la fijación biológica de nitrógeno. En el presente estudio, la aplicación de pruebas como catalasa, ureasa, utilización de citrato y producción de Indol fueron valiosas para identificar la nueva cepa de *Rhizobium spp*.

En síntesis los resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas fueron contrastados y comparados con el Manual de Bergey's, 2001, cuyos contenidos explican la clasificación taxonómica de todas las bacterias conocidas. Además fueron igualmente consultadas otras fuentes bibliográficas relacionadas con el tema de la fisiología y el metabolismo del género *Rhizobium spp*, y comparadas con otras bacterias que ecológicamente viven en la rizósfera de las leguminosas, fijando nitrógeno atmosférico.

Por lo que la información obtenida, a partir de las características macroscópicas de las colonias de la bacteria aislada, analizando en detalle las observaciones microscópicas, también corroborando los resultados con la literatura científica precedente, se concluye que se trata de una cepa nueva en cultivo puro de *Rhizobium spp*, aislada de los nódulos formados por simbiosis con la raíz de la

variedad de habichuela (*Vigna unguiculata L. var. Cantón-1*), cultivada en el organopónico Cuatro Caminos. Cienfuegos.

CONCLUSIONES

La separación y desinfección de los nódulos de la raíz de la habichuela (*Vigna unguiculata L. var. Cantón -1*), ofrece la posibilidad de poder trabajar con una muestra de cepas nativas de *Rhizobium spp.* La elección del método de las diluciones seriadas, y el cultivo en medio YEMA, resultó eficaz para observar las características macroscópicas de las colonias de la bacteria en estudio. La caracterización microscópica de las colonias típicas de *Rhizobium spp.*, mediante el método de la Tinción de Gram, y la realización posterior de las pruebas fisiológicas - bioquímicas, son concluyentes para afirmar que se ha logrado obtener una cepa nueva de *Rhizobium spp.* nativa y específica de la habichuela (*Vigna unguiculata L. var. Cantón -1*), cultivada en el organopónico Cuatro Caminos. Cienfuegos.

Conflicto de Intereses:

No existen conflictos de intereses

Contribuciones de los autores:

Autores	Tarea y contribución en el trabajo	Participación (%)
Orlando Gualberto Rodríguez del Rey Piña	Diseño de la investigación	100
Enrique Parets Selva	Supervisión y recolección de datos	90
Juana Arelis Díaz Jáuregui	Análisis de laboratorio	80
Yoandris Socarrás Armenteros	Discusión de los resultados	70
Cristian Alejandro Acosta Hiraola	Revisión de la bibliografía y Software	60

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajayi, O.O., Nwodo, D.C., Adediji, T., Ogwugwa, V.H., Dianda M., Fagade O.E. (2024). Resistencia a los antibióticos en cepas de rizobios fijadores de nitrógeno: implicaciones para la agricultura. Soil Microbiology Unit, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2006.01122.x>

Abril, A. B. (2022). Rhizobium y Bradyrhizobium: La importancia de su correcta identificación. *Revista de Investigaciones en Microbiología*, 25(3), 112-125. <https://doi.org/10.35537/rjm.2022.25.3.8>

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., & Prabhu, S. R. (2023). Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture: Functional Annotation and Future Challenges. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-99-0030-5>

Bergey's (2001). *Manual of Systematic Bacteriology (2nd ed., Vol. 1)*. Springer. Citado por Garrity, G. M., Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (Eds.). DOI 10.1007/berges-soutline200310

Bequer, J. C., Prévost, D., & Prieto, A. (2000). Isolation and characterization of Rhizobium strains from root nodules of tropical legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9), 1279-1283. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00042-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00042-1)

Brock, D. (2003). *Biología de los microorganismos. 10a Edición*. Editorial Omega. <https://archive.org/details/Brock-BiologiaDeLosMicroorganismos10Edicin>

Casasola Bado, M.J. (mayo-agosto 2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Rev. Colegio de Microb. Quím. Clín. de Costa Rica*, 27 (2). <https://archive.org/details/Brock-BiologiaDeLosMicroorganismos10Edicin/http://revista.microbiologicos.cr>

Chandrakanta, Baghel, D., Gupta, S. B., & Chowdhury, T. (2024). Characterization and Evaluation of Native Rhizobium of Groundnut (Arachis hypogaea L.) and Soybean (Glycine max L.). *Journal of Experimental Agriculture International*, 46(5), 500-506. <https://doi.org/10.9734/jeai/2024/v46i52403>

Champaneria, A., Iyer, B., & Rajkumar, S. (2022). Sequential uptake of aldoses over fructose and enhanced phosphate solubilization in Rhizobium sp. RM. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(11), 4251-4268. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11997-w>

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1987). Manual de métodos para la evaluación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas. CIAT. <https://www.gbif.org/es/publisher/fee3882f-5360-4f01-a1ca-767c48fa629c>

Contreras, S., López, M., & Martínez, J. (2007). Resistance of native Rhizobium strains to heavy metals in contaminated soils. *Journal of Environmental Microbiology*, 9(3), 123-130. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01122.x>

Dong-yeon, D. Lee, Leticia Galera-Laporta, Maja Bialecka-Fornal, Eun Chae Moon, Zhouxin Shen, Steven P. Briggs, Jordi Garcia-Ojalvo and Gürol M. Suel. (2019). Magnesium flux modulates ribosomes to increase bacterial survival. *Cell*, March 2019. DOI: [10.1016/j.cell.2019.01.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.042)

Encarnación, S., Dunn, M., Willms, K., & Mora, J. (1995). Fermentative and aerobic metabolism in Rhizobium etli. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3058-3066. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.3058-3066.1995>

Erismán, J. W. (2011). The Dutch nitrogen crisis: Lessons for global sustainability. *Environmental Science & Policy*, 14(8), 865-873. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2011.05.005>

- Fernández, M. (2003). Ecología microbiana del suelo: Fundamentos y aplicaciones. Mundi-Prensa. <https://www.mundiprensa.com>
- FAO/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (1985). Manual Técnico de la Fijación Simbiótica. <https://www.fao.org/4/ap665s/ap665s.pdf>
- Graham, P. H., & Van Kessel, C. (2000). Quantifying the nitrogen contribution from alfalfa to soil and two succeeding crops using nitrogen-15. *Agronomy Journal*, 92(1), 10-15. <https://doi.org/10.2134/agronj2000.92110x>
- González, J. E., Marketon, M. M., & Walker, G. C. (2018). Rhizobium biofilm formation and symbiosis with legumes. *Annual Review of Microbiology*, 72, 477-493. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062658>
- Gómez-Godínez, L. J., Martínez-Romero, E., Banuelos, J., & Arteaga-Garibay, R. I. (2023). Physiological and metabolic characterization of a novel Rhizobium strain isolated from Phaseolus vulgaris L. roots. *Archives of Microbiology*, 205(4), 144. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03483-2>
- Guianeya, Pérez, Gómez, Gretel, Nápoles, María C., & Morales, Belkis. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes*, 31(2), 1. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403942008000200005&lng=es&tlng=es
- Gebre, K. Y. (2025). Isolation, biochemical characterization, and greenhouse authentication of chickpea (Cicer arietinum L.) rhizobia collected from some major chickpea growing areas of Woldia, North Wollo, Ethiopia. *PLoS One*, 20(8), e0330169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0330169>
- Kang, Z., Zhao, X., Zhang, R., Zhang, T., Chen, X., & Li, S. (2023). Screening and characterization of salt-tolerant Rhizobium strains and their potential for alleviating salt stress in soybean. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1145062. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1145062>
- Kumar, S., & Dhar, B. (2023). *Biochemical and Molecular Characterization of Rhizobia and Their Potentiality as Biofertilizer*. In Microbial Biofertilizers and Micronutrient Availability (pp. 235-254). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16379-2_11
- Luo, S., Yin, J., Peng, Y., Xie, J., Wu, H., He, D., Li, X., & Cheng, G. (2020). Glutathione is involved in Detoxification of Peroxide and Root Nodule Symbiosis of Mesorhizobium huakuii. *Current Microbiology*, 77(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01784-8>
- Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M.M., Suazo Silva, J.L. (2001). *Microbiología y Parasitología Médica*. Editorial Ciencias Médicas.
- Martínez Viera, R. (1986). Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Publisher. Edit. Científico-Técnica. La Habana. https://books.google.com/books/about/Ciclo_biolo
- Maheshwari, H. S., Parmar, D., Gour, A., Patel, A., Kumar, S., Rajput, L. S., Vennampally, N., Bright, J. P., Singh, R. K., Sharma, M. P., & Singh, K. H. (2025). Serial enrichment incubation technique (SEIT) for rapid isolation of plant growth-promoting bacteria: Saving researcher time and lab resources. *MethodsX*, 15, 103677. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2025.103677>
- Ma, W., & Conway, J. (2025). Engineering auxin degradation into root-associated bacteria promotes plant growth. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2025.10.25.684584>
- Mondal, S., & Sen, A. (2024). Isolation of Rhizobium and screening based on plant growth of lentil. *Journal of Food Legumes*, 31(2) 235-285. <https://doi.org/10.59797/journaloffoodlegumes.v31i2.122>
- Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519-546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Paudyal, S. P., Kunwar, B., Paudel, N., & Das, B. D. (2021). Isolation and characterization of rhizobia from the root nodule of some cultivated legume crops. *European Journal of Biological Research*, 11(3), 288-296. DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4906255>
- Pardo, M. A., Lagunez, J., Miranda, J., & Martínez, E. (1994). Nodulating ability of Rhizobium tropici is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase. *Molecular Microbiology*, 11(2), 315-321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00311.x>
- Pérez-Álvarez, S., Ochoa-Chaparro, E. H., Anchondo-Páez, J. C., Escobedo-Bonilla, C. M., Rascón-Solano, J., Magallanes-Tapia, M. A., Uranga-Valencia, L. P., Hernández-Campos, R., & Sánchez, E. (2024). Nitrogen assimilation, biomass, and yield in response to application of algal extracts, Rhizobium spp., and Trichoderma asperellum as biofertilizers in hybrid maize. *Nitrogen*, 5(4), 1031-1047. <https://doi.org/10.3390/nitrogen5040066>
- Ramírez-Bahena, M.; Peix, Á.; Velázquez, E. y Bedmar, E.J. (2016). Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. *Arbor*, 192 (779): a319. Doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2016.779n3009>
- Sai, B. V., Pavana Praneetha, T., Masih, S. A., & Maxton, A. (2025). Rhizobium engineering for plant stress amelioration, reclaiming soil fertility for sustainable agro ecological system. *Environment Conservation Journal*, 26(3), 1127-1136. <https://doi.org/10.36953/ECJ.31133006>

- Sánchez, C., Vargas, M., & Leiva, S. (2022). Eficiencia de medios de cultivo para el aislamiento de rizobios nativos a partir de nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Revista de Biología Tropical*, 70(1), 123-135. <https://doi.org/10.15517/rbt.v70i1.48045>(<https://doi.org/10.15517/rbt.v70i1.4804>)
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). Handbook for rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium technology. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Vincent, J.M. (1975). *Manual Práctico de Rizobiología*. Edit. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires - Argentina. <https://search?client=firefox-b-d&q=Vincent%2C+J.M.+1975.+Manual+Práctico+de+Rizobiología.+Edit.+Editorial+Hemis>
- Wei, B., Luo, X., Ma, W., & Lv, P. (2022). Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel cold-resistant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification *Rhizobium* sp. WS7. *Bioresource Technology*, 362, 127756. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127756>