

Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Tolerance to abiotic stress and catalase production (Phase II)

Rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Tolerancia a estrés abiótico y producción de catalasa (Fase II)

C. J. Bécquer¹, Yaldreisy Galdo¹, Analeidis Mirabal¹, Maribel Quintana¹ and Adelaida Puentes²

¹Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental Sancti Spiritus, Apdo. 2255, Z. P. 1, C. P. 60100, Sancti Spiritus, Cuba

²Universidad "José Martí Pérez", Sancti Spiritus, Cuba

Email: pastosp@enet.cu

The objective of this research was to evaluate the tolerance to stressing abiotic factors of 11 isolated rhizobia from forage legumes (*Desmodium cannum*, *D. triflorum* and *Centrosema virginianum*) located in an arid ecosystem in Holguín, Cuba, and to qualitatively assess the catalase production of this isolates. The different levels of temperature, pH and NaCl were the stressing factors evaluated. Cultures were performed in solid and liquid mannitol-yeast medium, and the visible growth in the medium was considered as an evaluative criterion. All isolates grew at 34 and 35 °C, but none at 38 °C or 40 °C. Except two isolates (*C. virginianum* and *D. triflorum*), the rest grew at pH 4, and 9 of them at pH 10. All isolates grew in 0.4 % NaCl, but only one (*D. triflorum*) grew in 1.2 %. There was no growth in 2.4 % NaCl. All isolates reacted positively to H₂O₂. It was concluded that there were isolates tolerant to different stressing abiotic factors, as well as with catalase production. In addition, there were isolates that, independently of the macrosymbionts from which they originated and of the morpho-cultural group to which they were circumscribed, showed tolerance to different abiotic factors, such as acidity and alkalinity, high salt concentrations and growth at 35 °C. All this gives them potential for future application in agricultural practice under adverse environmental conditions. Inoculation tests of grasses and legumes under stressing environmental conditions are recommended to select the isolates with the highest positive effect on these cultures.

Key words: *forage legumes*, *Bradyrhizobium*, *abiotic stress*, *catalase*

Legumes have an immense value, due to their ability to raise soil fertility by the atmospheric nitrogen fixation through the symbiotic relation with the rhizobia. It has been known for more than a century, the ability of legumes to use N₂ from the air, through the efficient symbiotic relation established between these plants and nitrogen fixing bacteria. However, salinity, water scarcity, and stressing temperatures are important threats to legume-rhizobia symbiosis.

In Holguín province, as in others in Cuba, there are problems that make 45 % of the agricultural area have low or very low productive soils, among those that are affected by compaction, salinization, drought,

El objetivo de esta investigación fue evaluar la tolerancia a factores abióticos estresantes de 11 aislados de rizobios, procedentes de leguminosas forrajeras (*Desmodium cannum*, *D. triflorum* y *Centrosema virginianum*) localizadas en un ecosistema árido de Holguín, Cuba, y valorar cualitativamente la producción de catalasa de dichos aislados. Los diferentes niveles de temperatura, pH y NaCl fueron los factores estresantes evaluados. Se realizaron cultivos en medio levadura-mañitol sólido y líquido, y se consideró como criterio evaluativo el crecimiento visible en el medio. Todos los aislados crecieron a 34 y 35 °C, pero ninguno a 38 °C ni a 40 °C. Excepto dos aislados (*C. virginianum* y *D. triflorum*), el resto creció en pH 4, y nueve de ellos en pH 10. Todos los aislados crecieron en 0.4 % NaCl, pero solo uno (*D. triflorum*) creció en 1.2 %. No hubo crecimiento en 2.4 % NaCl. Todos los aislados reaccionaron positivamente ante el H₂O₂. Se concluye que hubo aislados tolerantes a diferentes factores abióticos estresantes, así como con producción de catalasa. Además, existieron aislados que, independientemente del macrosimbionte del que provenían y del grupo morfocultural al que se circunscribieron, presentaron tolerancia a diferentes factores abióticos, como la acidez y alcalinidad, las altas concentraciones de sal y el crecimiento a 35 °C. Todo esto les confiere potencialidades para su aplicación futura en la práctica agrícola en condiciones ambientales adversas. Se recomiendan ensayos de inoculación de gramíneas y leguminosas en condiciones ambientales estresantes para seleccionar los aislados con mayor efecto positivo en estos cultivos.

Palabras clave: *leguminosas forrajeras*, *Bradyrhizobium*, *estrés abiótico*, *catalasa*

Las leguminosas tienen un inmenso valor, debido a su capacidad de elevar la fertilidad del suelo mediante la fijación del nitrógeno atmosférico a través de la relación simbiótica con los rizobios. Es conocida, desde hace más de una centuria, la capacidad de las leguminosas para utilizar el N₂ del aire, a través de la eficiente relación simbiótica que se establece entre estas plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno. Sin embargo, la salinidad, la escasez de agua y las temperaturas estresantes resultan importantes amenazas para la simbiosis leguminosa-rizobio.

En la provincia de Holguín, al igual que en otras de Cuba, existen problemas que hacen que 45 % del área agrícola tenga suelos pocos productivos o muy pocos productivos,

acidity and deficient irrigation problems (Turrueles and Daley 2005). According to Oquendo *et al.* (2013), some limiting factors such as salinity, acidity, basicity, soil depth, and others of a climatic and physiographic nature, provoke this territory to have characteristics that are not suitable for the encouraging and exploitation of grasslands.

In Cuba, in recent years, in addition to the necessary measures for soil conservation, reforestation and exploitation, the use of rhizobia as biofertilizers has been increased, due to its appreciable benefits for plants and soil. Therefore, the study of rhizobia adapted to ecosystems with stressing environmental characteristics, should lead, not only to the contribution of new knowledge about their genetic diversity, but also to the selection of strains with the capacity to fix atmospheric nitrogen in symbiosis with legumes of interest for animal feeding. In addition to being useful for the stimulation the growth of plants not belonging to legumes family of, that must be cultivated under conditions of severe environmental stress (Bécquer, 2002 and Zahran *et al.* 2012).

While the strategies to improve legume production in saline environments include the selection of plant genotypes tolerant to high salinity conditions, the inoculation with salt tolerant rhizobia strains could be another approach to improve the productivity of legumes in symbiosis (Kenei *et al.* 2010). Yang *et al.* (2009) suggested that rhizobacteria can produce catalase to degrade oxidative oxygen species (ROS), resulting from drought stress, so researches to use this and other anti-stress properties of bacteria in the agriculture should be conducted.

The objective of this study was to evaluate the tolerance to stressing abiotic factors and the catalase production of rhizobia, which are microsymbionts in naturalized forage legumes from Holguín province, Cuba, for their future use in agricultural practice under stressing environmental conditions.

Materials and Methods

The isolates were evaluated in their ability to grow in mannitol-yeast liquid medium under different temperature levels (35, 38 and 40 °C), as well as at different NaCl values (0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2 and 2.4 %) and pH (6, 5.5, 5, 4.5, 4.8, 8.5, 9 and 10) (Bécquer 2002), to verify their resistance to the variations of physical-chemical stress. For this, the isolates were cultured in Petri dishes containing the mannitol- yeast solid medium with the different concentrations of NaCl and pH. The criterion for the description of the results was the visible growth (+) or non-growth (-) in the medium (Drouin *et al.* 1996). For the assays at different temperatures, inocula were made from an inoculation loop of suspensions with 10⁸ cell./ mL in test tubes (10.0 mL culture) which were placed in an orbital shaker at 200.0 rpm for

entre los que inciden la compactación, salinización, sequía, acidez y problemas de drenaje deficiente (Turrueles y Daley 2005). Según Oquendo *et al.* (2013), algunos factores limitantes como la salinidad, acidez, basicidad, profundidad del suelo, y otros de carácter climático y fisiográfico, provocan que este territorio posea características poco adecuadas para el fomento y la explotación de pastizales.

En Cuba, en los últimos años, además de las necesarias medidas para la conservación de suelos, reforestación y explotación juiciosa, se ha incrementado el uso de rizobios como biofertilizantes, debido a sus apreciables beneficios para las plantas y el suelo. Por ello, el estudio de rizobios adaptados a ecosistemas con características ambientes estresantes, debe conllevar, no solo al aporte de nuevos conocimientos acerca de su diversidad genética, sino también a la selección de cepas con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas de interés para la alimentación animal. Además de ser útil para la estimulación del crecimiento de plantas no pertenecientes a la familia de las leguminosas, que se deben cultivar en condiciones de estrés ambiental severo (Bécquer, 2002 y Zahran *et al.* 2012).

Mientras que las estrategias para mejorar la producción de leguminosas en ambientes salinos incluye la selección de genotipos vegetales tolerantes a condiciones de alta salinidad, la inoculación con cepas de rizobios tolerantes a la sal, pudiera constituir otro enfoque para mejorar la productividad de las leguminosas en simbiosis (Kenei *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2009) plantearon que las rizobacterias pueden producir catalasa para degradar la especies oxidativas del oxígeno (ROS), resultantes del estrés causado por la sequía, por lo que se deben desarrollar investigaciones dirigidas a utilizar esta y otras propiedades anti estrés de las bacterias en la agricultura.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la tolerancia a factores abióticos estresantes y la producción de catalasa de rizobios, que son microsymbiontes en leguminosas forrajeras naturalizadas de la provincia de Holguín, Cuba, para su futura utilización en la práctica agrícola en condiciones ambientales estresantes.

Materiales y Métodos

Los aislados se evaluaron en su habilidad para crecer en medio líquido levadura-mannitol en diferentes temperaturas (35, 38 y 40 °C), así como en diferentes valores de NaCl (0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 1.2 y 2.4 %) y de pH (6; 5,5; 5; 4,5; 4,8; 8,5; 9 y 10) (Bécquer 2002), para comprobar su resistencia ante las variaciones de stress físico-químico. Para ello se sembraron los aislados en placas Petri que contenían el medio sólido levadura-mannitol con las diferentes concentraciones de NaCl y pH. El criterio para la descripción de los resultados fue el crecimiento visible (+) o no crecimiento (-) en el medio (Drouin *et al.* 1996). Para los ensayos a diferentes temperaturas, se confeccionaron inóculos a partir de una asada de suspensiones con título de 10⁸ cél./mL en tubos de ensayo (10.0 mL de cultivo) que se colocaron en una

20 days. The criterion for describing the results was the visible growth (+) or non-growth (-) of the isolates in the liquid medium with presence of whitish turbidity (Drouin *et al.* 1996).

The purity of the suspensions was then checked by culturing 100 µL of the suspension in mannitol- yeast solid medium with Drygalsky spatula. As a control, the mannitol-yeast solid medium with its corresponding concentration of NaCl (0.01 %), pH 7 and temperature of 28 °C, was indistinctly used (Vincent 1970). All petri-dishes were incubated at 28 °C for 10 days, except those treatments where different temperature ranges were evaluated.

Presence of catalase in isolates. Colonies (24 h growth) were deposited on glass slides and a drop of H₂O₂ (30 %) was added. The appearance of gas bubbles showed the presence of the enzyme catalase (MacFaddin 1980). The criterion for the description of the results was the appearance of gas bubbles (+) or not (-) in the isolates.

Rhizobia isolate. A total of 11 rhizobia isolates were evaluated, which were previously identified and characterized by Bécquer *et al.* (2016), with phenotypic characteristics that make them close to the Bradyrhizobium genus. These isolates came from forage legumes located in an arid ecosystem of Holguín, Cuba (table 1).

Commercial strains used in the evaluations. Different commercial strains were used as comparison material in tolerance assessments for stressing abiotic factors (table 2).

zaranda orbital a 200.0 rpm durante 20 días. El criterio para la descripción de los resultados fue el de crecimiento visible (+) o no crecimiento (-) de los aislados en el medio líquido con presencia de turbidez blanquecina (Drouin *et al.* 1996). Posteriormente se comprobó la pureza de las suspensiones mediante siembra de 100 µL de la suspensión en medio sólido levadura-manitol con espátula de Drygalsky. Como testigo se utilizó el medio sólido levadura-manitol con su correspondiente concentración de NaCl (0.01 %), de pH 7 y temperatura de 28 °C, indistintamente (Vincent 1970). Todas las placas se incubaron a 28 °C durante 10 días, excepto aquellos tratamientos donde se evaluaron diferentes rangos de temperatura.

Presencia de catalasa en los aislados. Las colonias (24 h de crecimiento) fueron depositadas en portaobjetos de vidrio y se les añadió una gota de H₂O₂ (30 %). La aparición de burbujas de gas indicó la presencia de la enzima catalasa (MacFaddin 1980). El criterio para la descripción de los resultados fue el de aparición de burbujas de gas (+) o no (-) en los aislados.

Aislados de rizobios. Se evaluaron 11 aislados de rizobios, los cuales previamente se identificaron y caracterizaron por Bécquer *et al.* (2016), con características fenotípicas que los hace cercanos al género Bradyrhizobium. Estos aislados procedían de leguminosas forrajeras localizadas en un ecosistema árido de Holguín, Cuba (tabla 1).

Cepas comerciales utilizadas en las evaluaciones. Se utilizaron diferentes cepas comerciales que sirvieron de material de comparación en las evaluaciones de tolerancia a factores abióticos estresantes (tabla 2).

Table 1: Isolates and its natural microsymbiont

Isolate	Natural microsymbiont
Ho1	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho2	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho4	<i>Desmodium triflorum</i>
Ho5	<i>Desmodium triflorum</i>
Ho6	<i>Desmodium triflorum</i>
Ho7	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho8	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho9	<i>Desmodium cannum</i>
Ho10	<i>Desmodium cannum</i>
Ho12	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho13	<i>Centrosema virginianum</i>

Table 2: Commercial strains used in evaluations of tolerance to stressing abiotic factors

Strains	Genus & Species
ATCC 10004	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
CIAT 899 IIB	<i>Rhizobium tropici</i>
HAMBI 1174	<i>Rhizobium galegae</i>
CCBAU 2609	<i>Mesorhizobium loti</i>
NZP 2213	<i>Mesorhizobium huakuii</i>
ATCC 9930	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
USDA 110	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

Results and Discussion

Tolerance to stressing abiotic factors. The ability of microorganisms to grow under different culture conditions can widely vary, even among strains of the same species. However, there are some characteristics that may be typical of a species. Even when conditions are extreme, they can differentiate between genera or higher categories.

Resultados y Discusión

Tolerancia a factores abióticos estresantes. La capacidad de los microorganismos para crecer en diferentes condiciones de cultivo puede variar ampliamente, incluso entre cepas de la misma especie. Sin embargo, hay algunas características que pueden ser típicas de una especie. Incluso, cuando las condiciones son extremas, pueden diferenciar entre géneros o

Temperature. Table 3 shows the growth results at different temperatures. It is evident that from 38 °C onwards there was not growth of isolates, while at 35 °C all grew. Also at that temperature the control strains NZP 2213 (*Mesorhizobium huakuii*), HAMBI 1174 (*Rhizobium galegae*) and ATCC 9930 (*Sinorhizobium meliloti*) were also grown.

According to Hamdi (1985), the temperature range of growth for rhizobia isolated from the tropics is between 25 and 30 °C. According to the author cited, this is attributed to the fact that this group of bacteria does not have the capacity to form endospores, which constitute in these microorganisms resistance structures against unfavorable factors. However, Bécquer (2002) characterized *Bradyrhizobium sp.* strains, isolated from *Centrosema spp.*, which endured temperatures of 40 °C. This shows the wide genetic diversity of these bacteria. Although Hungria and Vargas (2000) consider that the selection of strains based on these temperature levels, *in vitro* applied, is not the best method for successful application of these bacteria in agricultural practice, Giongo *et al.* (2010) state that tolerance to high temperatures may be useful for selecting tolerant rhizobacteria at oscillating temperatures in the field.

Samrudhi *et al.* (2013) isolated rhizobia from soils under temperatures of over 50 °C, which showed their ability to survive and persist under extreme conditions.

By not evaluating the intermediate temperatures between 35 and 38 °C, the authors of this study could not establish the real limit of tolerance of these isolates at high temperatures. However, in the studies above mentioned it was evidenced that they did not tolerate the same temperature level of other isolates, belonging to *Bradyrhizobium* genus, and therefore other evaluations are necessary in the future.

Acidity. As shown in table 4, all isolates were able to grow in a pH range of 5 to 8.5, and most to pH 10. The growth at pH 5 is a differentiating character for *Rhizobium* species that form nodules in *Phaseolus* (Ramírez-Bahena *et al.* 2008). Hamdi (1985) places bradyrhizobia among the least tolerant to alkalinity, although Bécquer (2002) observed strains of this genus that grew at pH 11. In this study, at pH 4 and 4.5, except for two isolates that did not grow (one isolate from group *C. virginianum*: Ho8 and one isolate from group *Desmodium triflorum*: Ho5), the rest had normal growth. At pH 9 and 10, two isolates (Ho5, Ho6) from the *D. triflorum* group did not have growth, but the others did. This suggests the existence of adaptive mechanisms that allow it to survive under these conditions, a factor that could be applied to the isolates evaluated in this study, although they presumably belong to *Bradyrhizobium* genus (Bécquer *et al.* 2016).

In general, the group of *D. triflorum* showed the highest number of isolates that did not grow at extreme

categorías superiores.

Temperatura. En la tabla 3 se muestran los resultados del crecimiento a diferentes temperaturas. Se evidencia que de 38 °C en adelante no hubo crecimiento de aislados, mientras que a 35 °C sí crecieron todos. También a esa temperatura crecieron las cepas testigo NZP 2213 (*Mesorhizobium huakuii*), HAMBI 1174 (*Rhizobium galegae*) y ATCC 9930 (*Sinorhizobium meliloti*).

De acuerdo con Hamdi (1985), el rango de temperatura de crecimiento para los rizobios aislados de las zonas tropicales se encuentra entre 25 y 30 °C. Según el autor citado, esto se atribuye a que este grupo de bacterias no tiene la capacidad de formar endosporas, que constituyen en estos microorganismos estructuras de resistencia ante factores desfavorables. Sin embargo, Bécquer (2002) caracterizó cepas de *Bradyrhizobium sp.*, aisladas de *Centrosema spp.*, que toleraron temperaturas de 40 °C. Esto demuestra la amplia diversidad genética de estas bacterias. Aunque Hungria y Vargas (2000) consideran que la selección de cepas sobre la base de estos niveles de temperatura, aplicados *in vitro*, no es el mejor método para aplicaciones exitosas de estas bacterias en la práctica agrícola, Giongo *et al.* (2010) afirman que la tolerancia a altas temperaturas puede ser útil para seleccionar rizobacterias tolerantes a temperaturas oscilantes en el campo.

Samrudhi *et al.* (2013) aislaron rizobios de suelos bajo temperaturas de más de 50 °C, lo que demostró la habilidad de estos para sobrevivir y persistir en condiciones extremas.

Al no evaluar las temperaturas intermedias entre 35 y 38 °C, los autores de este estudio no pudieron establecer en este trabajo el límite real de tolerancia de estos aislados a altas temperaturas. No obstante, en los estudios antes mencionados se evidenció que no toleraron el mismo nivel de temperatura de otros aislados, pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, por lo que son necesarias otras evaluaciones en el futuro.

Acidez. Como muestra la tabla 4, todos los aislados fueron capaces de crecer en un rango de pH de 5 a 8.5, y la mayor parte hasta pH 10. El crecimiento a pH 5 es un carácter diferenciador para las especies de *Rhizobium* que forman nódulos en *Phaseolus* (Ramírez-Bahena *et al.* 2008). Hamdi (1985) sitúa a los bradyrhizobios entre los menos tolerantes a la alcalinidad, aunque Bécquer (2002) observó cepas de este género que crecieron en pH 11. En este trabajo, a pH 4 y 4.5, excepto dos aislados que no crecieron (un aislado del grupo *C. virginianum*: Ho8 y uno del grupo *Desmodium triflorum*: Ho5), el resto presentó crecimiento normal. En pH 9 y 10, dos aislados (Ho5, Ho6) del grupo de *D. triflorum* no presentaron crecimiento, pero los demás sí crecieron. Esto sugiere la presencia de mecanismos de adaptación que le permiten sobrevivir en estas condiciones, factor que se pudiera aplicar a los aislados evaluados en este estudio, aunque presuntamente pertenezcan al género *Bradyrhizobium* (Bécquer *et al.* 2016).

En general, el grupo de *D. triflorum* fue el que

Table 3: Growth of isolates and commercial strains at different temperature levels

Microbial cultures	Physical-chemical stressing factors		
	35 °C	38 °C	40 °C
New isolates			
Ho1	+	-	-
Ho2	+	-	-
Ho4	+	-	-
Ho5	+	-	-
Ho6	+	-	-
Ho7	+	-	-
Ho8	+	-	-
Ho9	+	-	-
Ho10	+	-	-
Ho12	+	-	-
Ho13	+	-	-
Commercial strains			
ATCC 10004	-	-	-
CIAT 899 IIB	-	-	-
HAMBI 1174	+	-	-
CCBAU 2609	-	-	-
NZP 2213	+	-	-
ATCC 9930	+	-	-
USDA 110	-	-	-

(+) Growth (-) Not growth

pH. In the case of the isolates Ho1, Ho2, Ho4, Ho7, Ho9, Ho10, Ho12 and Ho13, which grew indistinctly at extremely acidic pH and alkaline pH, all indicate that they are strong candidates to tolerate such wide ranges of pH in the soil, as it can happen in different livestock ecosystems of Cuba. None of the control strains grew at pH 10 but up to pH 9 and three of them grew at pH 4: NZP 2213 (*Mesorhizobium huakuii*), CCBAU 2609 (*M. loti*) and CIAT 899 (*R. tropici*) (table 4).

Salinity. As for tolerance to different salt levels, table 5 shows that all isolates grew in 0.4% NaCl, but from 0.5% NaCl, they had lower growth, especially the Ho9 and Ho10 isolates from group *D. cannum*. These results are considered normal, as rhizobia not usually grow at NaCl concentrations higher than 2% (Kuykendall 2005), although Zahran (2010) considered that the salt tolerance have different variations for some rhizobia. In this regard, Elsheikh and Wood (1990) asserted that variations in salt tolerance by rhizobia can be from 1 to 6%.

In this study, isolates from *C. virginianum* group (except Ho8) grew in greater numbers up to 0.8 % NaCl, while only one (Ho6) from the *D. triflorum* group grew from 0.5 %, but did so until 1.2 %. This shows a high degree of tolerance to salinity. No isolates tolerant to 2.4 % NaCl were detected.

mostró mayor número de aislados que no crecieron a pH extremos. En el caso de los aislados Ho1, Ho2, Ho4, Ho7, Ho9, Ho10, Ho12 y Ho13, que crecieron indistintamente a pH extremadamente ácido y a pH alcalino, todo indica que son fuertes candidatos para tolerar esos rangos tan amplios de pH en el suelo, como puede ocurrir en diferentes ecosistemas ganaderos de Cuba. Ninguna de las cepas testigo creció en pH 10 sino hasta pH 9, y tres de ellas crecieron en pH 4: NZP 2213 (*Mesorhizobium huakuii*), CCBAU 2609 (*M. loti*) y CIAT 899 (*R. tropici*) (tabla 4).

Salinidad. En cuanto a la tolerancia a diferentes niveles de sal, en la tabla 5 se muestra que todos los aislados crecieron en 0.4 % NaCl, pero a partir de 0.5 % NaCl, tuvieron menor crecimiento, sobre todo los aislados Ho9, y Ho10, del grupo de *D. cannum*. Estos resultados se consideran normales, ya que los rizobios no crecen habitualmente a concentraciones de NaCl superiores a 2 % (Kuykendall 2005), aunque Zahran (2010) consideró que la tolerancia a la sal presenta diferentes variaciones para algunos rizobios. Al respecto, Elsheikh y Wood (1990) aseguraron que las variaciones de tolerancia a la sal por los rizobios puede ser de 1 a 6 %.

En este estudio, los aislados del grupo de *C. virginianum* (excepto Ho8) crecieron en mayor número hasta 0.8 % de NaCl, mientras que solo uno (Ho6) del grupo de

Table 4: Growth of isolates and commercial strains at different pH levels

Microbial cultures	Physical – chemical stressing factors								
	pH 6	pH 5,5	pH 5	pH 4,5	pH 4	pH 8	pH 8,5	pH 9	pH 10
New isolates									
Ho1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ho2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ho4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ho5	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Ho6	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ho7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ho8	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ho9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ho10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ho12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ho13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Commercial cultures									
ATCC 10004	+	+	+	-	-	+	+	+	-
CIAT 899 IIB	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HAMBI 1174	+	+	+	-	-	+	+	+	-
CCBAU 2609	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NZP 2213	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 9930	+	+	+	-	-	+	+	+	-
USDA 110	+	+	+	+	-	+	+	+	-

(+) Growth (-) Not growth

Although the isolates that tolerated high concentrations of NaCl could belong to Bradyrhizobium genus because of their morphocultural characteristics (Bécquer *et al.* 2016), in studies carried out by Marquina *et al.* (2011) on the influence of different concentrations of NaCl on the growth of some strains, it was reported that fast-growing rhizobia have the capacity to accumulate polyamines in less time (osmotic stabilizer), and to use nutrients more quickly for the growth and multiplication, compared to slow-growing rhizobia. Zahran *et al.* (2012) isolated rhizobia belonging to Rhizobium and Sinorhizobium genus, tolerant to 1 and 2 % NaCl. Also, Shamseldin and Werner (2005) pointed out that salinity tolerance is another property of fast growing autochthonous strains belonging to Rhizobium genus with respect to the slow-growing symbionts from Bradyrhizobium genus.

The results obtained with the control strains, which grew up to 1 % NaCl, could be a proof of these statements. However, this tolerance of fast-growing rhizobia is not absolute, since species from Sinorhizobium genus have been identified, repressing genes related to central metabolism, elongation factors, ADN ligases, chaperone proteins and some of the proteins involved in the cell division process, when increasing NaCl concentrations in the culture medium (Fujihara and Yonehama 1993).

The plants increase their resistance to salinity and

D. triflorum creció a partir de 0.5 %, pero lo hizo hasta 1.2 %. Esto indica alto grado de tolerancia a la salinidad. No se detectaron aislados tolerantes a 2.4 % NaCl.

A pesar que los aislados que toleraron altas concentraciones de NaCl podrían pertenecer al género Bradyrhizobium por sus características morfoculturales (Bécquer *et al.*, 2016), en estudios realizados por Marquina *et al.* (2011) acerca de la influencia de diferentes concentraciones de NaCl en el crecimiento de algunas cepas, se informó que los rizobios de rápido crecimiento tienen la capacidad de acumular poliaminas en menos tiempo (estabilizador osmótico), y utilizar con mayor rapidez nutrientes necesarios para el crecimiento y la multiplicación, en comparación con los rizobios de lento crecimiento. Zahran *et al.* (2012) aislaron rizobios pertenecientes a los géneros Rhizobium y Sinorhizobium, tolerantes a 1 y 2 % NaCl. También Shamseldin y Werner (2005) señalaron que la tolerancia a la salinidad es otra propiedad de las cepas autóctonas de crecimiento rápido, pertenecientes al género Rhizobium con respecto a los simbiontes de crecimiento lento del género Bradyrhizobium.

Los resultados obtenidos con las cepas testigo, que crecieron hasta 1 % NaCl, pudieran constituir una prueba de estas afirmaciones. Sin embargo, esta tolerancia de los rizobios de rápido crecimiento no es absoluta, ya que se han identificado especies del género Sinorhizobium, en las que se reprimían genes relacionados con el metabolismo central, factores de elongación, ADN

Table 5: Growth of isolates and commercial strains at different NaCl levels

Microbial cultures	Physical –chemical stressing factors, NaCl								
	0.4 %	0.5 %	0.6 %	0.7 %	0.8 %	0.9 %	1%	1.2 %	2.4 %
New isolates									
Ho1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ho2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ho4	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ho5	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ho6	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ho7	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ho8	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ho9	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Ho10	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ho12	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Ho13	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Commercial strains									
ATCC 10004	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CIAT 899 IIB	+	+	+	+	+	+	+	-	-
HAMBI 1174	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CCBAU 2609	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NZP 2213	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ATCC 9930	+	+	+	+	+	+	+	-	-
USDA 110	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(+)Growth (-) Not growth

drought by the action of proline, which has the ability to supply reducing power to maintain the metabolism of the bacteroid until the normal state of hydration of the plant is restored and, in turn, contribute to maintain the cell turgor. Therefore, the results of this study suggest that the response of rhizobia to abiotic stress corresponds more to the continued response of these to the environmental conditions in which they were isolated than intrinsic traits to their phylogeny.

According to Li *et al.* (2011), the rhizobia isolated from soils affected by salinity are usually highly tolerable to this abiotic factor. An increase in external salinity and osmolarity triggers the loss of water in the cell, causing a decrease in cytoplasmic volume, reducing turgidity and dehydration of the cytoplasm (Sleator and Hill, 2002).

Although the soil in which the collection was made is weakly saline, its high K content (57.77 mg/100 g K₂O) makes it a strong candidate for the influence of high concentrations of this element in the genetic expression of some isolates for salinity tolerance. Potassium, being the most abundant intracellular cation, makes the highest contribution in the cell's turgor pressure, playing an important role in osmotic adaptation of bacteria, pH regulation, genetic expression and activation of cellular enzymes (Epstein, 2003). According to Balaji *et al.* (2005), the high levels of K, after an osmotic change, act

ligasas, proteínas chaperonas y algunas de las proteínas que intervienen en el proceso de división celular, al incrementarse las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo (Fujihara y Yonehama 1993).

Las plantas aumentan su resistencia a la salinidad y a la sequía por la acción de la prolina, que tiene la capacidad de suministrar poder reductor para mantener el metabolismo del bacteroide hasta que se restablezca el estado normal de hidratación de la planta y, a su vez, contribuir a mantener la turgencia celular. Por ello, los resultados de este trabajo sugieren que la respuesta de los rizobios al estrés abiótico corresponde más a la respuesta continuada de estos a las condiciones ambientales en las que se aislaron que a rasgos intrínsecos a su filogenia.

Según Li *et al.* (2011), los rizobios aislados de suelos afectados por salinidad suelen ser altamente tolerables a este factor abiótico. Un aumento en la salinidad externa y la osmolaridad dispara la pérdida de agua de la célula, que causa decrecimiento en el volumen citoplasmático, reduciéndose la turgencia y la deshidratación del citoplasma (Sleator y Hill, 2002).

Aunque el suelo en el que se realizó la colecta es débilmente salino, su alto contenido de K (57.77 mg/100 g K₂O) (datos no mostrados) lo hace un fuerte candidato a la influencia de las altas concentraciones de este elemento en la expresión genética de algunos aislados para la tolerancia a la salinidad. El potasio, al ser el catión intracelular más abundante, hace la mayor contribución en la presión de turgencia de las células, al desempeñar una función

as a second messenger to activate other osmotically activated responses.

In this study, there were isolates (Ho6, Ho12, Ho13) that, independently of the macrosymbionts from which they originated and of the morphocultural group to which they were circumscribed, showed tolerance to different abiotic factors, such as acidity and alkalinity, high salt concentrations, and grew at 35 °C. It is possible that they belong to the same species that shows a wide reaction standard of their genotype, allowing their adaptation to different stressing environmental conditions (Bécquer, 2002).

Presence of catalase. In this study the catalase presence of the native isolates was qualitatively evaluated as part of the criteria for their future application in cultures that are under drought stress, based on the assertion of Goyal *et al.* (1986) and Vanderlinde *et al.* (2010) that rhizobia produce antioxidants (catalase) and other compounds to survive in extreme environments, especially under drought.

Table 6 shows the results of this type of test, in which all isolates reacted positively to the H₂O₂ added to the bacterial colony, with the consequent formation of gas bubbles. The Ho13 isolate showed weak reaction. The commercial strains also showed a positive reaction, indicating that these, like native isolates, produce catalase. This result corroborates to that informed by Hanyu *et al.* (2009) about the presence of genes encoding catalase in *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* and *Mesorhizobium loti*, although this enzyme may be monofunctional (catalase) or bifunctional (catalase-peroxidase) in these genera. This allows them adopting different strategies in their survival, inside or outside the plant.

According to Hussain *et al.* (2014), the capacity of rhizobia of producing catalase and exopolysaccharides constitutes not only a factor for drought tolerance, but also a reliable attribute to select efficient isolates like PGPR, to be applied in plants not belonging to the legume family. These same authors showed that rhizobia isolates from *Lens culinaris* L., *Vigna radiata* L. and *Cicer arietinum* L. were able to survive water scarcity, thanks to their ability to produce catalase. This helps them to save the cell membrane and nucleic acid from destruction that occurs under conditions of environmental stress (Boumahdi *et al.* 1999).

It is concluded that there were isolates tolerant to different stressing abiotic factors, as well as catalase production. In addition, there were isolates, which independently of the macrosymbionts from which they originated and of the morpho-cultural group to which they were circumscribed, showed tolerance to different abiotic factors (acidity and alkalinity, high salt concentrations and growth at 35 °C), which conferred high potential for their future application in agricultural practice under adverse environmental conditions. It is recommended to carry out inoculation tests of grasses

importante en la adaptación osmótica de las bacterias, regulación del pH, expresión genética y activación de las enzimas celulares (Epstein, 2003). De acuerdo con Balaji *et al.* (2005), los niveles altos de K, después de un cambio osmótico, actúan como un segundo mensajero para activar otras respuestas activadas osmóticamente.

En este trabajo hubo aislados (Ho6, Ho12, Ho13) que, independientemente del macrosimbionte del cual provenían y del grupo morfo-cultural al que se circunscribieron, presentaron tolerancia a diferentes factores abióticos, como acidez y alcalinidad, altas concentraciones de sal, y crecieron a 35 °C. Es posible que pertenezcan a una misma especie que muestra amplia norma de reacción de su genotipo, lo que permite su adaptación a diferentes condiciones ambientales estresantes (Bécquer, 2002).

Presencia de catalasa. En este trabajo se evaluó cualitativamente la presencia de catalasa de los aislados nativos, como parte del criterio para su futura aplicación en cultivos que se encuentren bajo estrés de sequía, sobre la base de la afirmación de Goyal *et al.* (1986) y Vanderlinde *et al.* (2010) acerca de que los rizobios producen antioxidantes (catalasa) y otros compuestos para sobrevivir en ambientes extremos, especialmente bajo sequía.

En la tabla 6 se muestran los resultados de ese tipo de prueba, en la que se observa que todos los aislados reaccionaron positivamente al H₂O₂ añadido a la colonia bacteriana, con la consiguiente formación de burbujas de gas. El aislado Ho13 presentó débil reacción. Las cepas comerciales también mostraron reacción positiva, lo que indica que estas, al igual que los aislados nativos, producen catalasa. Este resultado corrobora lo informado por Hanyu *et al.* (2009) acerca de la presencia de genes que codifican para catalasa en *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* y *Mesorhizobium loti*, aunque esta enzima puede ser monofuncional (catalasa) o bifuncional (catalasa-peroxidasa) en estos géneros. Esto les permite adoptar diferentes estrategias en su supervivencia, dentro o fuera de la planta.

Según Hussain *et al.* (2014), la capacidad de los rizobios de producir catalasa y exopolisacáridos constituye no solo un factor para la tolerancia a la sequía, sino un atributo confiable para seleccionar aislados eficientes como PGPR, para aplicar en plantas no pertenecientes a la familia de las leguminosas. Estos mismos autores demostraron que aislados de rizobios provenientes de *Lens culinaris* L., *Vigna radiata* L. y *Cicer arietinum* L. presentaron capacidad de sobrevivir a la escasez de agua, gracias a su capacidad de producir catalasa. Esto les ayuda a salvar la membrana celular y el ácido nucleico de la destrucción que ocurre en condiciones de estrés ambiental (Boumahdi *et al.* 1999).

Se concluye que hubo aislados tolerantes a diferentes factores abióticos estresantes, así como con producción de catalasa. Además, existieron aislados, que independientemente del macrosimbionte del que provenían y del grupo morfo-cultural al cual se circunscribieron, presentaron tolerancia a

Table 6: Reaction to H₂O₂ of isolates and commercial strains

Microbial cultures	Emergence of gas bubbles
New isolates	
Ho1	+
Ho2	+
Ho4	+
Ho5	+
Ho6	+
Ho7	+
Ho8	+
Ho9	+
Ho10	+
Ho12	+
Ho13	+/-
Commercial strains	
ATCC 10004	+
CIAT 899 IIB	+
HAMBI 1174	+
CCBAU 2609	+
NZP 2213	+
ATCC 9930	+
USDA 110	+

(+) Strong reaction (+/-) Weak reaction (-) No reaction

and legumes under stressing environmental conditions to select the isolates with the highest positive effect on these cultures.

diferentes factores abióticos (acidez y alcalinidad, altas concentraciones de sal y crecimiento a 35 °C), lo que les confiere alto potencial para su aplicación futura en la práctica agrícola en condiciones ambientales adversas. Se recomienda realizar ensayos de inoculación de gramíneas y leguminosas en condiciones ambientales estresantes para seleccionar los aislados con mayor efecto positivo en estos cultivos.

References

- Balaji, B., O'Connor, K., Lucas, J. R., Anderson, J. M. & Csonka, L. N. 2005. "Timing of Induction of Osmotically Controlled Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, Determined with Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR". *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 8273–8283, ISSN: 0099-2240, 1098-5336, DOI: 10.1128/AEM.71.12.8273-8283.2005.
- Bécquer, C. J. 2002. Caracterización y selección de rizobios, aislados de leguminosas nativas de Sancti Spíritus, Cuba. Ph.D. Thesis, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 140 p.
- Bécquer, C. J., Galdo, Y., Ramos, Y., Peña, M. D., Almaguer, N., Peña, Y. F., Mirabal, A., Quintana, M. & Puentes, A. 2016. "Risobios nativos de un ecosistema árido de Holguín. Cuba: su morfología y Tolerancia a stress abiótico". In: III Taller Latinoamericano de PGPR, Pucón, Chile: ALAR - Universidad de la Frontera, p. 21, Available: <<http://www.alaronline.org/2016/02/iii-taller-latinoamericano-de-pgpr/>>, [Consulted: February 2, 2017].
- Boumahdi, M., Mary, P. & Hornez, J. P. 1999. "Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia". *Journal of Applied Microbiology*, 87(4): 611–619, ISSN: 1365-2672, DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00860.x.
- Drouin, P., Prevost, D. & Antoun, H. 1996. "Classification of Bacteria Nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in Northern Quebec as Strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4): 1016–1024, ISSN: 0020-7713, 1465-2102, DOI: 10.1099/00207713-46-4-1016.
- Elsheikh, E. A. E. & Wood, M. 1990. "Rhizobia and bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation". *Letters in Applied Microbiology*, 10(3): 127–129, ISSN: 1472-765X, DOI: 10.1111/j.1472-765X.1990.tb00098.x.
- Epstein, W. 2003. "The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria". In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular*

- Biology, vol. 75, Elsevier, pp. 293–320, ISBN: 978-0-12-540075-6, DOI: 10.1016/S0079-6603(03)75008-9, Available: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660303750089>>, [Consulted: February 1, 2017].
- Fujihara, S. & Yoneyama, T. 1993. “Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017”. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 1104–1109, ISSN: 0099-2240, 1098-5336.
- Giongo, A., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Kayser, L., Stroschein, M. R., Eltz, F. L., Bodanese-Zanettini, M. H. & Pereira, L. M. 2010. “Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizoplane of a legume (*Lupinus albus*) in sandy soil”. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(2): 361–369, ISSN: 0100-0683, DOI: 10.1590/S0100-06832010000200009.
- Goyal, V., Chetal, S. & Nainawatee, H. S. 1986. “Alterations in *Rhizobium trifolii* catalase under water stress”. *Folia Microbiologica*, 31(2): 164–166, ISSN: 0015-5632, 1874-9356, DOI: 10.1007/BF02926835.
- Hamdi, Y. A. 1985. *La fijación biológica del nitrógeno*. Roma, Italia: FAO, 160 p.
- Hanyu, M., Fujimoto, H., Tejima, K. & Saeki, K. 2009. “Functional Differences of Two Distinct Catalases in *Mesorhizobium loti* MAF303099 under Free-Living and Symbiotic Conditions”. *Journal of Bacteriology*, 191(5): 1463–1471, ISSN: 0021-9193, 1098-5530, DOI: 10.1128/JB.01583-08.
- Hernández, I., Nápoles, M. C., Pérez, G., Rosales, P. R., Baños, R. & Ramírez, J. F. 2012. “Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*”. *Cultivos Tropicales*, 33(4): 21–28, ISSN: 0258-5936.
- Hungria, M. & Vargas, M. A. T. 2000. “Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil”. *Field Crops Research*, 65(2–3): 151–164, ISSN: 0378-4290, DOI: 10.1016/S0378-4290(99)00084-2.
- Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Asghar, H. N. & Asghar, M. 2014. “Can Catalase and Exopolysaccharides Producing *Rhizobia* Ameliorate Drought Stress in Wheat?”. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(1): 3–13, ISSN: 1560-8530.
- Keneni, A., Prabu, P. C. & Assefa, F. 2010. “Characterization of Acid and Salt Tolerant Rhizobial Strains Isolated from Faba Bean Fields of Wollo, Northern Ethiopia”. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12(0): 365–376, ISSN: 1680-7073.
- Kuykendall, L. D. 2005. “Order VI. Rhizobiales ord. nov.”. In: Bergey, D. H., Boone, D. R. & Garrity, G. M., *Bergey’s manual of systematic bacteriology. Part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria)*, 2nd ed., vol. 2, New York: Springer Science + Business Media, p. 324, ISBN: 978-0-387-24145-6, Available: <<http://www.springer.com/gp/book/9780387241456>>, [Consulted: February 2, 2017].
- Li, Q. Q., Wang, E. T., Chang, Y. L., Zhang, Y. Z., Zhang, Y. M., Sui, X. H., Chen, W. F. & Chen, W. X. 2011. “*Ensifer sojae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8): 1981–1988, DOI: 10.1099/ijs.0.025049-0.
- Mac Faddin, J. F. 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 527 p., ISBN: 978-0-683-05315-9.
- Marquina, M. E., González, N. E. & Castro, Y. 2011. “Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela”. *Revista de Biología Tropical*, 59(3): 1017–1036, ISSN: 0034-7744.
- Oquendo, G., Pupo, N., Corella, P., Machado, R., Olivera, Y., Iglesias, J. M. & Swaby, Y. 2013. “Prospección y colecta de especies forrajeras en formaciones vegetales del municipio Rafael Freyre, Holguín, Cuba”. *Pastos y Forrajes*, 36(2): 159–168, ISSN: 0864-0394.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E. 2008. “Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov.”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11): 2484–2490, ISSN: 1466-5034, DOI: 10.1099/ijs.0.65621-0.
- Shamseldin, A. & Werner, D. 2005. “High Salt and High pH Tolerance of New Isolated *Rhizobium etli* Strains from Egyptian Soils”. *Current Microbiology*, 50(1): 11–16, ISSN: 0343-8651, 1432-0991, DOI: 10.1007/s00284-004-4391-7.
- Samrudhi, R., Sharma, S. R., Rao, N. K., Gokhale, T. S. & Ismail, S. 2013. “Isolation and characterization of salt-tolerant rhizobia native to the desert soils of United Arab Emirates”. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(2): 102–108, ISSN: 2079-0538.
- Sleator, R. D. & Hill, C. 2002. “Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence”. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1): 49–71, ISSN: 0168-6445, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00598.x.
- Turrulles, H. R. & Daley, P. M. 2009. *La degradación de los suelos en la provincia de Holguín: un problema de alta significación*. Santa Fe, Argentina: El Cid Editor, 7 p., Available: <<http://catalogobibliografico.uniagustiniana.edu.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=380780>>, [Consulted: February 2, 2017].
- Vanderlinde, E. M., Harrison, J. J., Muszyński, A., Carlson, R. W., Turner, R. J. & Yost, C. K. 2010. “Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841”. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(3): 327–340, ISSN: 0168-6496, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00824.x.
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*. (ser. IBP Handbook, no. ser. 15), Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 164 p.
- Yang, J., Kloepper, J. W. & Ryu, C.-M. 2009. “Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress”. *Trends in Plant Science*, 14(1): 1–4, ISSN: 1360-1385, DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.004.
- Zahran, H. H. 2010. “Legumes–Microbes Interactions Under Stressed Environments”. In: Khan, D. M. S., Musarrat, P. D.

J. & Zaidi, D. A. (eds.), *Microbes for Legume Improvement*, Springer Vienna, pp. 353–387, ISBN: 978-3-211-99752-9, DOI: 10.1007/978-3-211-99753-6_15, Available: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-211-99753-6_15>, [Consulted: February 2, 2017].

Zahran, H. H., Abdel-Fattah, M., Yasser, M. M., Mahmoud, A. M. & Bedmar, E. J. 2012. “Diversity and Environmental Stress Responses of Rhizobial Bacteria from Egyptian Grain Legumes”. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(10): 571–583, ISSN: 1991-8178.

Received: November 1, 2016