



Estabilidad microbiológica de los biofertilizantes Azofert®-F y Azofert®-S

Microbiological stability of Azofert®-F and Azofert®-S biofertilizers

 Belkis Morales-Mena^{1*},  Ionel Hernández-Forte¹,  María Caridad Nápoles-García¹

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

RESUMEN: Azofert® es un biofertilizante a base de bacterias diazotróficas denominadas rizobios para la inoculación de leguminosas de interés agrícola. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la calidad microbiológica de los biofertilizantes Azofert®-F y Azofert®-S. Se elaboraron inoculantes a base de dos cepas: *Rhizobium leguminosarum* y *Brayrhizobium elkanii* y se conservaron a 4 y 32 °C. Se determinó la concentración de ambas cepas mediante el método de las diluciones decimales seriadas. Además, se determinó la presencia de contaminantes en los inoculantes, mediante tinción de Gram. Los resultados mostraron que los inoculantes de ambas cepas se mantuvieron puros durante todo el experimento. Los inoculantes que se conservaron a 4 °C mantuvieron una concentración celular en el orden de 10⁸ UFC mL⁻¹ durante el mayor tiempo. Esta concentración es adecuada para el empleo de estos productos en el campo. Los resultados obtenidos permitirían establecer una estrategia productiva de los inoculantes cubanos Azofert®-F y Azofert®-S, según las condiciones de temperatura disponibles.

Palabras clave: conservación, *Rhizobium*, temperatura, viabilidad.

ABSTRACT: Azofert® is a biofertilizer with a diazotrophic bacteria named rhizobia for the legumes inoculation. The present work aimed to evaluate the microbiological quality of the Azofert®-F and Azofert®-S biofertilizers with. Inoculants were made from two strains *Rhizobium leguminosarum* and *Brayrhizobium elkanii* and it was stored at 4 and 32 °C. The concentration of both strains was determined by the serial dilutions method. In addition, the presence of contaminants in the inoculants was determined by Gram staining. Results showed that inoculants of both strains remained pure throughout the experiment. The inoculants stored at 4 °C maintained a cell concentration of 10⁸ CFU mL for longer. This concentration is suitable for the use of these products in the field. These results allow establishing a productive strategy of the Azofert®-F and Azofert®-S Cuban inoculants, according to the available temperature conditions.

Key words: conservation, *Rhizobium*, temperature, viability.

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de fertilizantes minerales en la agricultura ha ocasionado daños a los diferentes ecosistemas. La erosión de los suelos y la contaminación de aguas superficiales y subterráneas por nitratos, constituyen evidencias del mal manejo de los fertilizantes en la actividad agrícola. Esto constituye una problemática

para la salud de todos los seres vivos que habitan en dichos ecosistemas (1). En este sentido, el empleo de biofertilizantes en la práctica agrícola se considera una alternativa viable, al ser un recurso económico y ecológicamente sano; y porque permite reducir el empleo de fertilizantes minerales (2) e incrementar el rendimiento de los cultivos (3-6).

*Autor para correspondencia: belkis@inca.edu.cu

Recibido: 08/03/2021

Aceptado: 30/08/2021

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

Contribución de los autores: **Conceptualización-** Belkis Morales Mena, María Caridad Nápoles García. **Investigación-** Belkis Morales Mena, Ionel Hernández Forte, María Caridad Nápoles García. **Supervisión-** Ionel Hernández Forte, María Caridad Nápoles García. **Escritura del borrador inicial-** Belkis Morales Mena. **Escritura y edición final y Curación de datos-** Belkis Morales Mena, María Caridad Nápoles García, Ionel Hernández Forte.

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



Diversos microorganismos, los denominados Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, constituyen el principio activo en los biofertilizantes. Entre estos, se encuentran los rizobios, bacterias diazotróficas que se han estudiado, fundamentalmente, por la asociación simbiótica que establecen con las plantas leguminosas. Este grupo bacteriano logra satisfacer entre el 50-100 % de las necesidades nitrogenadas de los cultivos de interés agrícola (6).

Se han desarrollado y aplicado inoculantes a base de estas bacterias en los sistemas de producción agrícola. Tales bioproductos contienen altas concentraciones de bacterias y la aplicación directa a las semillas, en dosis bajas (200 mL de inoculante por cada 50 kg de semillas) en el momento de la siembra (7), permite ahorrar entre el 50-70 % del fertilizante químico en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (8,9) y hasta el 100 % en soya (*Glycine max* L.) (10).

Dentro de los biofertilizantes que se emplean ampliamente en Cuba para las leguminosas, se encuentra el Azofert®. En la actualidad, este bioproducto es un inoculante líquido que se distingue del resto de los biofertilizantes nacionales por contener elevadas concentraciones de factores de nodulación, señal determinante en la simbiosis rizobio-leguminosa (11,12). Azofert®, elaborado y comercializado en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), posee tres productos registrados: Azofert®-S (para soya), Azofert®-F (para frijol) y Azofert®-Can (para *Canavalia ensiformis* L.), los cuales han sido validados con éxito en diferentes condiciones edafoclimáticas, pues incrementaron la nodulación, el crecimiento y los rendimientos de estos cultivos (10,13,14).

Sin embargo, en numerosas ocasiones, tras la aplicación de inoculantes en el campo, no se observa un efecto positivo en el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Este comportamiento se ha atribuido, entre otros factores, a las bajas concentraciones y desfavorables condiciones fisiológicas de las células bacterianas presentes en los inoculantes (15-17).

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha establecido que la concentración de los microorganismos que componen estos productos es uno de los parámetros de calidad más importantes a tener en cuenta, ya que determina el éxito de la colonización y el establecimiento posterior de la simbiosis entre ambos organismos (18). Las concentraciones requeridas de rizobios en el inoculante varían en todo el mundo. Se considera como un criterio común, poseer una concentración mínima en el orden de 10^8 UFC mL⁻¹ ó g⁻¹ y una contaminación mínima o nula (19). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad en el tiempo de las cepas de rizobios que forman parte de los biofertilizantes Azofert®-F y Azofert®-S.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Planta de producción de Biofertilizantes, del Departamento de Fisiología y

Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Se evaluó la viabilidad de las cepas *Rhizobium leguminosarum* CF1 (CF1) y *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001 (ICA 8001), procedentes de los ceparios del Instituto de Suelos y del INCA, respectivamente. Dichas cepas constituyen la fracción activa de los biofertilizantes Azofert®-F y Azofert®-S, producidos y comercializados por el INCA, para la inoculación en los cultivos de frijol y soya (20,21).

Colonias aisladas de las cepas CF1 e ICA 8001, previamente cultivadas en placas Petri con medio Levadura-manitol sólido, con rojo Congo, a 28 °C durante tres y siete días, respectivamente, se multiplicaron en Erlenmeyers de 100 mL de capacidad, que contenían 20 mL del medio de cultivo Bradyfact (18) estéril. Los frascos se mantuvieron en condiciones de agitación a 130 rpm y 28 °C, durante 16 horas para la cepa CF1 y 72 horas para la cepa ICA 8001. A partir de estos pre-inóculos, se realizó el escalado de multiplicación de las cepas por fermentación aerobia, en iguales condiciones de temperatura e incubación, hasta un volumen total de 2000 mL. Se envasaron 200 mL de cada inóculo en frascos estériles de 240 mL y se establecieron dos tratamientos, en cada uno de ellos; el primero, se conservó a 4 °C y, el segundo, a temperatura ambiente promedio de 32 °C. Se determinó la calidad microbiológica de los inoculantes, para lo cual se tuvo en cuenta la pureza y la concentración de células viables de las cepas CF1 e ICA 8001 en los inoculantes.

La pureza de los cultivos se verificó mediante la Tinción de Gram, al inicio y al final del experimento. Se tuvo en cuenta las características morfológicas, la respuesta a la tinción y la presencia de endoesporas en las células de ambas cepas bacterianas. Además, se determinó la presencia de microorganismos contaminantes en el inoculante (22).

Para determinar la concentración de las cepas CF1 e ICA 8001 viables se tomaron tres muestras. A partir de estas, se realizaron diluciones decimales seriadas, de las que se cultivaron 0,1 mL en placas con medio levadura-manitol sólido (23). Las placas se incubaron a 30 °C durante tres días para la cepa CF1 y siete días para la cepa ICA 8001. Se cuantificó el número de colonias por placa y se determinó el número de UFC mL⁻¹, según la expresión:

$$\text{UFCmL}^{-1} = \text{No. col} \times 10^{-1} \times d$$

Donde:

No. col: número de colonias

d: factor de dilución

Estas evaluaciones se llevaron a cabo hasta que la concentración de las cepas en los inoculantes fuera inferior a 10^8 UFC mL⁻¹. En el biofertilizante Azofert®-F, conservado a ambas temperaturas, las evaluaciones se realizaron cada siete días durante los primeros 42 días y, posteriormente, se realizaron cada 21 días, mientras que en Azofert®-S se muestreó cada 30 días.

Análisis estadístico

Se empleó el diseño experimental completamente aleatorizado en todos los experimentos. Los datos obtenidos se procesaron por un análisis de varianza de clasificación simple. La prueba de comparación de medias de Tukey para $p < 0,05$ se utilizó para discriminar diferencias entre tratamientos (24). Los datos se procesaron en el programa Statgraphics Plus versión 5.1, 2001 y se graficaron en el programa Microsoft Excel, 2016.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La conservación adecuada de los inoculantes, después de su elaboración, constituye un aspecto importante para preservar la calidad microbiológica de los mismos y, con ello, su comercialización y efectividad en el campo. El principal parámetro para medir la vida útil de los inoculantes es un adecuado número de células viables aptas para adaptarse y sobrevivir en el medio, una vez inoculadas sobre las semillas (19). Es por ello, que en esta investigación fue de gran interés realizar un estudio desde el punto de vista microbiológico de dos biofertilizantes cubanos Azofert®-F y Azofert®-S.

La tinción de Gram permitió observar bacilos Gram negativos y sin endoesporas, lo que concuerda con las características morfológicas que se plantea en el registro de los inoculantes Azofert®-F y Azofert®-S, elaborados a base de cepas de rizobios de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (20,21). En ninguno de los dos inoculantes se observó la presencia de microorganismos con otra morfología y respuesta a la tinción.

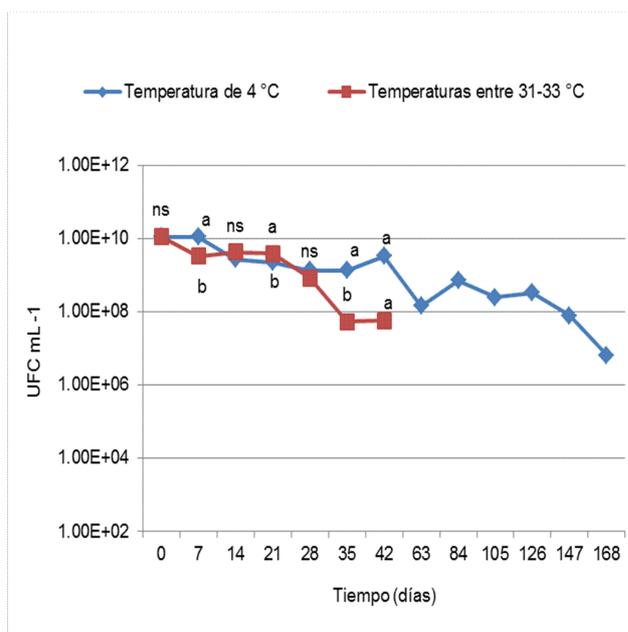
La viabilidad de la cepa CF1 en Azofert®-F, conservado en las diferentes temperaturas, se muestra en la Figura 1.

Los resultados mostraron que la concentración de la cepa CF1 se mantuvo en 1×10^8 UFC mL⁻¹, valores que se consideran óptimos para su empleo, hasta los 126 días a 4 °C. Sin embargo, esta concentración bacteriana se mantuvo en solo 28 días en aquellos inoculantes que se mantuvieron a 32 °C. Ambos tratamientos se diferenciaron, significativamente, entre sí, a los 35 días de conservación, a favor de los mantenidos a temperatura refrigerada.

En estudios similares, se ha informado de la conservación a 5 y 28 °C de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, en los cuales una de estas permaneció tres veces más tiempo viable (180 días) que la otra (60 días), al mantenerse a 5 °C. Además, en este estudio se constató que las evaluaciones que se realizaron a los inoculantes conservados a temperatura ambiente mostraron el descenso en una unidad logarítmica, a partir de los 30 días, para una de las cepas de *Bradyrhizobium* que se estudiaron (25).

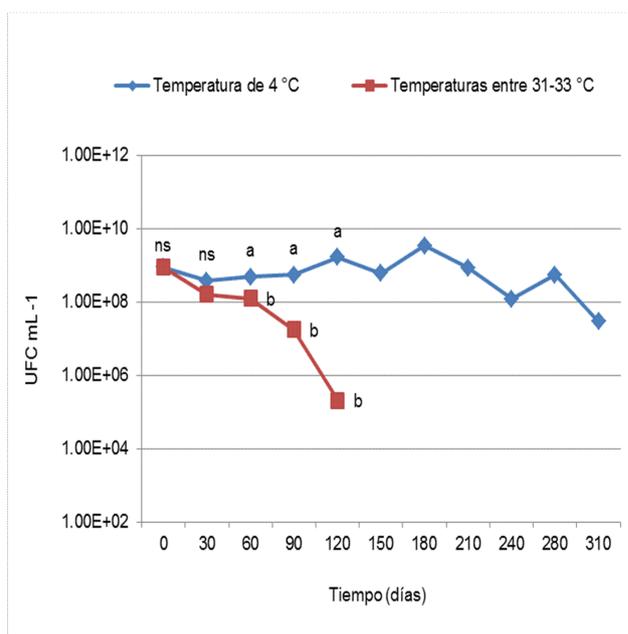
Por otra parte, la viabilidad de la cepa ICA 8001 en el inoculante para soya Azofert®-S, en diferentes temperaturas de almacenamiento, se muestra en la Figura 2.

En los primeros 30 días de evaluación, la viabilidad celular no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. A partir de este momento, la conservación a



El análisis estadístico se realizó en cada momento de evaluación. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p \leq 0,05$, $n=3$)

Figura 1. Viabilidad de la cepa *R. leguminosarum* CF1 en el biofertilizante Azofert®-F, almacenado a 4 °C y 32 °C, durante 42 días



El análisis estadístico se realizó en cada momento de evaluación. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p \leq 0,05$, $n=3$)

Figura 2. Viabilidad de la cepa *B. elkanii* ICA 8001 en el biofertilizante Azofert®-S, almacenado a 4 °C y 32 °C, durante 120 días

4 °C afectó de manera positiva el número de células en el inoculante, pues mantuvo durante 280 días, valores aceptables para la aplicación del inoculante en campo. Los inoculantes conservados a 32 °C mostraron valores de viabilidad apropiados para su empleo, sólo hasta los

primeros 60 días. A partir de ese momento, la concentración celular disminuyó a valores no adecuados para su uso.

A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, otros autores han informado que la concentración de *Azospirillum brasilense* en el inoculante líquido conservado a 4 °C no supera los 60 días (26).

La temperatura (26,27), la especie bacteriana y la formulación, son algunos de los factores que más influyen en el mantenimiento de la concentración celular del agente activo de los inoculantes (28). Los rizobios presentan una temperatura óptima para su crecimiento de 30 °C (29,30). A estas temperaturas se favorece el consumo de los nutrientes del medio (31), lo que provoca el agotamiento más acelerado de estos, con la consecuente disminución de la viabilidad bacteriana (32). Esto pudiera explicar, en alguna medida, la rápida disminución de la viabilidad en los inoculantes almacenados a temperatura ambiente.

A temperaturas entre 4 y 6 °C, el período de almacenamiento de los rizobios aumenta, por la reducción de la actividad metabólica de las células (33). La conservación de microorganismos a estas temperaturas permite una alta supervivencia bacteriana, estabilidad celular y pureza en los cultivos (34). Esto pudiera explicar la sobrevivencia por más tiempo de las cepas CF1 e ICA 8001 cuando se conservaron a 4 °C.

En los estudios realizados en esta investigación, se emplearon dos cepas pertenecientes al grupo de los rizobios, conservadas en el mismo medio de cultivo y temperaturas. Sin embargo, se comportaron diferentes en condiciones de conservación semejantes. La especie (genotipo) al que pertenece un microorganismo constituye uno de los factores que explicaría este comportamiento. Estudios anteriores demostraron que la velocidad de multiplicación de cepas de *Rhizobium* sp es varias veces superior a la cepa ICA 8001 (35), con un máximo de multiplicación celular a las 24 y 55 horas, respectivamente. Además, se ha comprobado que los rizobios del género *Rhizobium*, presentan un tiempo de vida media más corto que las especies de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*), durante su almacenamiento (28).

Independientemente de que en este estudio se constató un efecto positivo de la refrigeración en la viabilidad celular, se evidenció una disminución de la concentración de las cepas bacterianas en el tiempo. Durante el ciclo de vida de los microorganismos, éstos transitan por diversas fases con características diferentes, donde pueden o no encontrar las condiciones para su crecimiento y división celular. El envejecimiento del cultivo, por ejemplo, provoca la acumulación de compuestos tóxicos en el medio de cultivo y el agotamiento de los nutrientes existentes (32), lo que provoca una disminución del agente activo en los inoculantes. De ahí, la importancia de desarrollar formulaciones donde se empleen conservantes apropiados que incrementen la vida útil de estos productos.

CONCLUSIONES

La temperatura de conservación constituye un factor que influye en la viabilidad y la concentración del ingrediente activo de los biofertilizantes Azofert®-F y Azofert®-S. La conservación de estos productos a 4 °C mantiene por más tiempo un orden de 10⁸ UFC mL⁻¹ de las cepas *Rhizobium leguminosarum* CF1 y *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001, concentración que se considera adecuada para su empleo en el campo. Estos resultados permiten establecer una estrategia productiva de los inoculantes, según las condiciones de temperatura disponibles.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta estos resultados, es imprescindible realizar estudios de formulaciones con agentes que permitan preservar, por más tiempo, altas concentraciones del ingrediente activo de estos productos, incrementando así su vida útil.

BIBLIOGRAFÍA

1. Campoverde León, K. D. (2019). Evaluación de cambios ambientales sobre el balance de carbono y nitrógeno en el suelo. 53 p.
2. Martínez F, García C, Gómez LA, Aguilar Y, Martínez-Viera R, Castellanos N, et al. Manejo sostenible de suelos en la agricultura cubana. *Agroecología*. 2017;12(1):38-25.
3. Ortega M, Shagarodsky T, Dibut BL, Ríos Y, Tejeda G y Gómez LA. Influencia de la interacción entre el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y la inoculación con cepas seleccionadas de *Mesorhizobium* spp. *Cultivos Tropicales*. 2016;37(1):27-20. ISSN 0258-5936.
4. Gómez-Padilla E, Ruiz-Díez B, Fajardo S, Eichler-Loebermann B, Samson R, Van-Damme P, et al. Caracterización de rizobios aislados de nódulos de frijol caupí, en suelos salinos de Cuba. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(4):49-39. ISSN: 0258-5936.
5. Martínez L, Maqueira LA, Nápoles MC y Núñez MC. Efecto de bioestimulantes en el rendimiento de dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Biofertilizados. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(2):113-118. ISSN: 0258-5936.
6. Zuffo AM, Steiner F, Busch A y Zoz T. Response of early soybean cultivars to nitrogen fertilization associated with *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 2018;48(4):446-436. ISSN 1517-6398. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632018v48i52637>
7. CENATOX. Centro Nacional de Toxicología. Dictamen Toxicológico del Azofert®; 2016. 4 p.
8. Estrada W, Chávez L, Jerez E, Nápoles MC, Sosa A, Cordoví C, et al. Efecto del Azofert® en el rendimiento de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de déficit hídrico. *Centro Agrícola*. 2017;44(3):42-36. ISSN: 2072-2001.

9. Hernández L y Salido Y. Influencia de la aplicación de Azofert inoculante a base *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. Delicias 364 en finca Juan Sáez. Manatí. Caribeña de Ciencias Sociales, (enero) [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 30]; ISSN: 2254-7630. Available from: <https://www.eumed.net/rev/caribe/2019/01/cultivo-frijol-comun.html>
10. Sauvu C, Nápoles MC, Rodríguez AB, Lamz A, Ruiz M. Bioestimulantes en el crecimiento y rendimiento de soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Cultivos Tropicales. 2020;41(3): 02. ISSN: 0258-5936.
11. Nápoles MC, Cabrera JC, Onderwater R, Wattiez R, Hernández I, Martínez L, et al. Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cultivos Tropicales. 2016;37(2):44-37. ISSN: 0258-5936.
12. Nápoles MC, Cabrera JC, Wegria G, Onderwater R, Wattiez R, Hernández I, et al. Inducción de señales en la interacción *Mesorhizobium cicerii*-*Cicer arietinum* L. Cultivos Tropicales. 2018; 39(2): 107-101. ISSN: 0258-5936.
13. Rodríguez AB, González-Peña D, Nápoles MC, Morales D, Núñez M, Cartaya O, et al. Oligosacarinas como bioestimulantes para la agricultura cubana. Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. 2020;11(1): 852 p. ISSN: 2304.
14. Martín GM, Tamayo Y, Hernández I, Varela M y da Silva E. Cuantificación de la fijación biológica de nitrógeno en *Canavalia ensiformis* crecida en un suelo pardo mullido carbonatado mediante los métodos de abundancia natural de 15N y diferencia de N total. Cultivos Tropicales. 2017;38(1):130-122. ISSN: 0258-5936.
15. Bashan Y, de Bashan LE y Prabhu SR. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. In Agriculturally important microorganisms. In: Singh H, Sarma B, Keswani C. (eds). Springer, Singapore; 2016. 15-46 p. Print ISBN 978-981-10-2575-4. doi https://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1_2
16. Bernabeu PR. Caracterización de la colonización y promoción del crecimiento vegetal por *Burkholderia tropica* en gramíneas [Tesis de Doctorado] [La Plata]: Universidad Nacional de la Plata: 2017. 233 p.
17. Chávez-Díaz IF, Zelaya LX, Cruz CI, Rojas E, Ruíz S y de los Santos S. Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro-biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 2020;11(6):1436-1423. ISSN: 2007-0934.
18. Nápoles MC, Gutiérrez A y Corbera J. Medio de cultivo para *Bradyrhizobium japonicum*. Biopreparado resultante. Cuba; Patente de Invención No. 22 797, OCPI, 2002.
19. Izaguirre-Mayoral ML, Labandera C y Sanjuán J. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. 1ª ed. Montevideo, Uruguay: Imprenta Denad Internacional S.A; 2007. 100 p.
20. MINAG, Ministerio de la Agricultura. Registro Central de Fertilizantes, departamento de fertilizantes. Certificado de registro No. 002/2017, inscripto en el libro primero, tomo I, folio 041. La Habana. Cuba; 2017.
21. MINAG, Ministerio de la Agricultura. Registro Central de Fertilizantes, departamento de fertilizantes. Certificado de registro No. 004/2005, inscripto en el libro primero, tomo I, folio 033. La Habana. Cuba; 2013.
22. Norris DO y Daves RA. Legume bacteriology Tropical Pasteur Reserch. Principles and Methods. C. A. B. Bill, 1976. vol 51; p. 174-134.
23. Vincent JM. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. In: International Programme Handbook. No. 15. England: Oxford. Blackwele scientific publications; 1970. 164 p. ISBN 978-0-632-06410-6.
24. Sigarroa A. Biometría y diseño experimental. Primera parte. La Habana, Cuba: Editorial Pueblo y Educación; 1985. 328-319 p.
25. Cozzi JG y Benintende GB y Pacheco JC. Nuevo inoculante líquido para semillas de soja (*Glycine max*). Revista de la Facultad de Agronomía. 1996;16(1/2):132-127.
26. Cortés-Patiño SA y Bonilla RR. Polymers selection for a liquid inoculant of *Azospirillum brasilense* based on the Arrhenius thermodynamic model. African Journal of Biotechnology. 2015;14(33):2553-2547. ISSN: 1684-5315. doi: [10.5897/AJB2015.14777](https://doi.org/10.5897/AJB2015.14777)
27. González EJ. Modelo factorial para el control de calidad de biofertilizantes de importancia agrícola. [Bogotá]; 2017. 40 p.
28. Tittabutr P, Payakapong W, Teamroong N, Singleton PW y Boonkerd N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. Science Asia. 2007;33(1):77-69. doi: [10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.069](https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.069).
29. Caballero PC, Ferreira RA y Nakayama HD. Caracterización morfológica de aislados nativos de *Bradyrhizobium* sp. y tolerancia a condiciones de estrés [Internet]. Revista Científica de la Juventud. 2019 [cited 2019 November 1];(1):120-111. Available from: <https://www.juventud.gov.py/ojs/index.php/snj1/article/view/10>
30. Bécquer CJ, Galdo Y, Mirabal A y Quintana M. Rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Tolerancia a estrés abiótico y producción de catalasa (Fase II) [Internet]. Cuban Journal of Agricultural Science. 2017 [cited 2019 November 1];51(1):127-117. Available from: <http://www.cjasience.com/index.php/CJAS/article/view/692>
31. Estrada GA, Bonilla RR y Diván VL. Efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre la calidad de bioinoculantes turbosos. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2009;10(2):213-205. ISSN: 0122-8706.
32. Castro AM. Bacteriología médica basada en problemas. 2da ed. México, Editorial: El Manual Moderno S.A.; 2014. 327 p. ISBN: 6074484090, 9786074484090.
33. Freire JRJ y Sato ML. Conservación de cultivos de rizobios. Revista Latinoamericana de Microbiología-México. 1999; 41(1):42-35.
34. Sarmiento Y, Cárdenas DM y Hazel A. Evaluation of the stability of *Trichoderma* sp. and *Azotobacter* sp. preserved by different methods. Revista Colombiana de Biotecnología. 2013; 15(1):158-150. ISSN: 0123-3475.
35. Hernández I y Nápoles MC. Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de un aislado de rizobio. Cultivos Tropicales. 2018; 39(3): 90-87. ISSN: 0258-5936.