



## Efecto de la temperatura y el tiempo de conservación en la calidad de Azofert®-F

### Effect of temperature and storage time on the Azofert®-F's quality

<sup>1</sup>Belkis Morales Mena\*, <sup>2</sup>María Caridad Nápoles García, <sup>3</sup>Ionel Hernández Forte

Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera a Tapaste, Km 3 1/2, Gaveta postal No.1, CP 32700. San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de conservación en la concentración del principio activo y la actividad biológica del biofertilizante Azofert®-F. Inoculantes a base de la cepa *Rhizobium leguminosarum* CF1 se mantuvieron a 4 y 29±2 °C, para evaluar la pureza y concentración de la cepa cada 30 días durante 180 días. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple. A los 40 y 120 días de conservación de los inoculantes, se aplicaron en semillas de frijol cultivar Tazumal y se evaluó el número de nódulos y su efectividad, la masa seca de nódulos, raíces y parte aérea y el contenido relativo de clorofilas totales, en condiciones controladas. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado y los datos se procesaron mediante un arreglo bifactorial. La cepa *Rhizobium leguminosarum* CF1 mantuvo una concentración de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, o superior, durante 150 y 90 días, cuando el producto Azofert®-F se conservó a 4 y 29±2 °C, respectivamente. El almacenamiento del producto hasta 120 días, en ambas temperaturas, no afectó el número de nódulos en las plantas de frijol. Sin embargo, la temperatura y el tiempo de almacenamiento del inoculante influyeron en la efectividad de los nódulos formados y en el contenido relativo de clorofilas totales, respectivamente. Esta investigación es la primera que aborda la influencia de la conservación en la eficacia de un inoculante comercial cubano a base de *Rhizobium*, para el cultivo del frijol.

**Palabras clave:** *Rhizobium*, biofertilizantes, estabilidad en almacenamiento, frijol.

**ABSTRACT:** The objective of this work was to determine the effect of temperature and storage time on the concentration of the active principle and the biological activity of the Azofert®-F biofertilizer. Inoculants with *Rhizobium leguminosarum* CF1 strain were stored at 4 and 29±2 °C, to determine purity and strain concentration every 30 during 180 days. Data were processed using a simple classification analysis of variance. At 40 and 120 days of conservation of the inoculants, Tazumal cultivar were applied to bean seeds and the number of nodules and their effectiveness, the dry mass of nodules, roots and aerial part and the relative content of total chlorophylls were evaluated, in controlled conditions. A completely randomized experimental design was used and the data were processed using a bifactorial arrangement. *Rhizobium leguminosarum* CF1 strain maintained a concentration of 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> or higher for 150 and 90 days, when Azofert®-F was stored at 4 and 29±2 °C, respectively. Product storage for 120 days at both temperatures did not affect the number of nodules in bean plants. Nevertheless, temperature and inoculant storage time, influenced the effectiveness of formed nodules and the relative content of total chlorophylls, respectively. This research is the firstone about the conservation influence on the efficacy of a Cuban commercial inoculant based on *Rhizobium* for beans.

**Key words:** *Rhizobium*, inoculant, microbiological stability, bean.

\*Autor para correspondencia: [bmorales@inca.edu.cu](mailto:bmorales@inca.edu.cu)

Recibido: 04/01/2022

Aceptado: 14/02/2022

**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. **Metodología y escritura del borrador inicial-** Belkis Morales Mena. **Supervisión-** Ionel Hernández Forte, María Caridad Nápoles García. **Escritura, 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/>



## INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de gran importancia en la alimentación humana. Su grano es rico en proteínas, aporta micronutrientes, fibra y almidón (1,2). Esta leguminosa demanda altas cantidades de nitrógeno, elemento que obtiene, en gran medida, a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (3, 4).

Dentro de los microorganismos que realizan la FBN se encuentran los rizobios, bacterias que tradicionalmente se utilizan como principio activo en la biofertilización de leguminosas. El empleo de biofertilizantes en la práctica agrícola se considera una alternativa viable por sus beneficios ecológicos, económicos y productivos; permite reducir el empleo de fertilizantes minerales (5,6) e incrementar el rendimiento de cultivos de importancia económica (7,8).

En Cuba, se producen y comercializan diversos biofertilizantes, entre los que destaca el Azofert®, procedente del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). En particular, Azofert®-F se emplea en el cultivo del frijol, es un inoculante líquido que contiene altas concentraciones de la cepa bacteriana *Rhizobium leguminosarum* CF1 (CF1) y de inductores de la nodulación, atributo que lo distingue del resto de los inoculantes comerciales a base de rizobios en el país (9). Su aplicación directa a las semillas de frijol en el momento de la siembra, permite ahorrar entre el 50-70 % del fertilizante nitrogenado (10,11).

La ausencia de microorganismos contaminantes, la concentración de células viables y su estado fisiológico, son algunos de los factores que inciden en el desempeño exitoso de los biofertilizantes (12). Las normas de calidad que rigen el empleo de estos biopreparados varían en dependencia de las regulaciones vigentes en cada país. Sin embargo, se recomienda, en consenso, una concentración mínima del ingrediente activo de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> ó g<sup>-1</sup>, en el momento de su elaboración y de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> ó g<sup>-1</sup>, a su vencimiento, con una mínima o nula presencia de microorganismos contaminantes (13).

La vida útil de los biofertilizantes es esencial para su comercialización, debido al prolongado tiempo que puede transcurrir entre su producción y la aplicación (14). Por consiguiente, determinar el periodo de efectividad de estos bioproductos, según las capacidades de conservación disponibles, resulta imprescindible para delimitar su tiempo de validez y poder establecer una estrategia de producción y comercialización que satisfaga la demanda en el momento oportuno de las siembras.

Existen pocos estudios en Cuba que abordan la estabilidad microbiológica en el tiempo de inoculantes comerciales líquidos. Los principios activos más empleados en el país son Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal como *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Mesorhizobium* (15-17). En la mayoría de estos estudios, no se logra

acceder a los detalles de la investigación desde los buscadores disponibles en internet y, en muchos casos, se restringe el acceso a la información. Solo una investigación previa determinó el efecto de la temperatura en la conservación de un inoculante comercial a base de rizobios para soya (18). Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la temperatura y el tiempo de conservación en la concentración del principio activo y la actividad biológica del biofertilizante Azofert®-F.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon pre inóculos en Erlenmeyers de 100 mL de capacidad, que contenían 10 mL del medio de cultivo Bradyfact (9) estéril. Para ello, se empleó una azada de la cepa CF1 conservada en tubos con medio Levadura-manitol (LM) (19) sólido con rojo Congo. Los frascos se mantuvieron en agitación a 130 rpm y 28 °C, durante 16 h. Posteriormente, se continuó el escalado de la multiplicación de la cepa por fermentación aerobia, en iguales condiciones de incubación. En cada caso se inoculó el 10 % (volumen de inóculo/volumen de medio) hasta obtener un volumen total de 1000 mL del inoculante. El fermentado se formuló con 1000 mL de medio Bradyfact estéril en una relación 1:1.

El formulado (Azofert®-F) se envasó en diez frascos estériles de 240 mL de volumen total, cada uno con 200 mL del producto. Se establecieron dos tratamientos con cinco frascos cada uno. Un tratamiento se almacenó a temperatura refrigerada de 4 °C y el otro a temperatura ambiente promedio de 29±2 °C.

### Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la concentración de la cepa CF1 en Azofert®-F

El ensayo transcurrió desde octubre de 2017 a febrero de 2018. Se escogieron al azar tres frascos almacenados en cada condición de temperatura y se determinó la pureza microbiológica del inoculante, mediante tinción de Gram. Se utilizó como criterio de distinción las características morfo tintoriales descritas para las bacterias del grupo de los rizobios (20).

El número de unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) de la cepa CF1 se evaluó en el momento de la elaboración de los inoculantes y, cada 30 días, en ambas condiciones de temperatura. Para ello, se realizaron diluciones decimales seriadas del inoculante, las cuales se cultivaron por diseminación en placas con medio LM sólido con rojo Congo. Los cultivos se incubaron a 28 °C por 72 h. El cálculo del número de UFC se realizó mediante la fórmula:

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

donde:

No. col - número de colonias

d - factor de la dilución

## Efecto de la aplicación de Azofert®-F almacenado a diferentes temperaturas y tiempos de conservación en la nodulación, el crecimiento y el contenido de clorofilas de plantas de frijol

Se realizaron ensayos de inoculación en macetas de 973,90 cm<sup>3</sup> de volumen total, que contenían 0,2 kg de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico eútrico (21), procedente del área central del INCA. El sustrato se extrajo a una profundidad entre 0-20 cm y su análisis químico se realizó según el manual para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos (22). El suelo tuvo un pH ligeramente ácido, contenido medio de materia orgánica, bajo de Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y altos de K<sup>+</sup> y P. El contenido de Ca<sup>2+</sup> se correspondió con lo que normalmente se informa para este tipo de suelo (23) (Tabla 1).

Se determinó, además, la concentración de posibles rizobios residentes en el sustrato. Para esto, un gramo de suelo se adicionó en 9 mL de agua destilada estéril y se realizaron diluciones decimales seriadas. Una alícuota de 0,1 mL se cultivó en placas con medio LM sólido con rojo Congo y el cultivo se incubó 10 días a 28 °C. El sustrato presentó una concentración de 3 x 10<sup>3</sup> UFC g suelo<sup>-1</sup> de posibles rizobios.

Para evaluar el efecto del formulado en la nodulación y el crecimiento de plantas de frijol, se establecieron dos ensayos en macetas, con cinco plantas por tratamiento cada uno. En el primero, se utilizaron inoculantes con 40 días de conservación a 4 y 29±2 °C, con una concentración bacteriana de 10<sup>9</sup> y 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. En el segundo ensayo se emplearon inoculantes con 120 días de conservación en 4 y 29±2 °C y con una concentración de 10<sup>8</sup> y 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Se sembraron dos semillas de frijol por maceta y cada una se inoculó con 200 µL de los inoculantes descritos con anterioridad. Las macetas se colocaron en bandejas con solución nutritiva de Hoagland (24), carente de la solución A (rica en sales de nitrógeno) para así favorecer la FBN. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas a 25±2 °C, 70 % de humedad relativa y fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Diez días después de la emergencia, se retiró una plántula de cada maceta.

Treinta días después de la siembra, se determinó el número de nódulos totales (u) y el número de nódulos totales efectivos (u). La efectividad de los nódulos se evaluó mediante corte transversal de éstos con escalpelo y observación de la coloración interna. Una coloración roja,

rosada o marrón, en el interior de los nódulos se interpretó como efectivos en la FBN (25). Se evaluó la masa seca de los nódulos totales (g), la masa seca de la parte aérea de las plantas (g) y la masa seca del sistema radical (g) con balanza digital, modelo TE214S (Marca Sartorius). El contenido relativo de clorofilas totales se determinó en el tercer foliolo de abajo hacia arriba (unidades SPAD), con un medidor portátil de clorofila (MINOLTA SPAD 502 Plus).

## Diseño y análisis estadístico

Los datos de concentración de la cepa CF1 se analizaron mediante 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. Los datos se procesaron en el Programa Statgraphics Plus versión 5.1 (2001) y se graficaron en el Programa Microsoft Excel, 2016.

En el ensayo de inoculación en plantas se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado y los resultados se sometieron a un arreglo bifactorial y se tuvieron en cuenta dos factores: temperatura, con los niveles: 4 y 29±2 °C y el tiempo con los niveles: 40 y 120 días. Los datos se sometieron a un test de Between y se procesaron en el programa estadístico SPSS versión 21.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La conservación de Azofert®-F a 4 °C mantiene concentraciones superiores de la cepa CF1 en el tiempo.

El cultivo de los inoculantes en medio LM sólido mostró la formación de colonias grandes y mucosas que no absorben el colorante rojo Congo. La tinción de Gram permitió observar bacilos Gram negativos, sin endosporas y la ausencia de microorganismos contaminantes. Estas características coinciden con las descritas para la cepa CF1, ingrediente activo del Azofert®-F (20).

Una preocupación común en la producción de inoculantes es la supervivencia del principio activo, por lo que la concentración de sus células constituye uno de los parámetros de calidad más importantes (26). Este estudio abordó dicha problemática, según las posibilidades de almacenamiento existentes para la conservación del Azofert®-F. Los resultados mostraron que la conservación de Azofert®-F a 4 °C mantuvo concentraciones más elevadas de la cepa CF1 en el tiempo (Figura 1).

La concentración de la cepa CF1 se mantuvo por encima de 1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> cuando se conservó a 4 °C durante 150 días, mientras que a 29±2 °C permaneció en esos

**Tabla 1.** Características químicas del sustrato suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico eútrico que se empleó en los ensayos de inoculación

pH	Materia orgánica (g kg <sup>-1</sup> )	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
		cmol <sub>c</sub> (kg <sup>-1</sup> )				
6,7	34,9	0,09	0,56	14,5	1,0	218,0

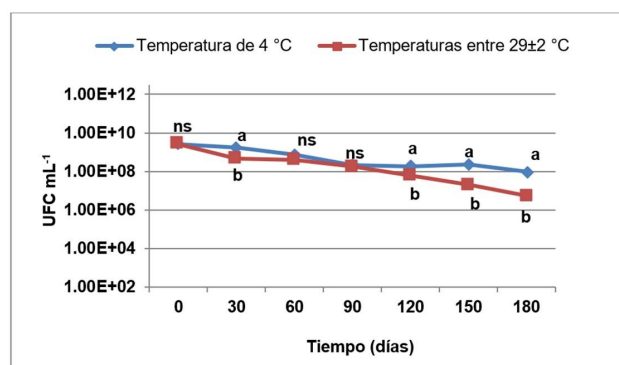
pH por potenciometría: relación suelo/solución 1:2,5; materia orgánica mediante colorimetría (Walkley Black); cationes intercambiables Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (complejometría mediante extracción con NH<sub>4</sub>Ac a 1 mol L<sup>-1</sup> a pH 7); K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> por fotometría de llama; P mediante extracción con ácido sulfúrico a 0,1 N, método de Oniani

niveles sólo por 90 días. La conservación de Azofert®-F a 4 °C mostró valores superiores de viabilidad a los obtenidos en el bioproducto conservado a temperatura ambiente a los 30, 120, 150 y 180 días posteriores a su elaboración. En estudios similares, con inoculantes de *Sinorhizobium meliloti* en el medio de cultivo LM y almacenados a 4 °C, se informa que el número de células viables disminuyó considerablemente después de 90 días (27). Esta diferencia en el comportamiento pudo deberse a las diferencias entre las cepas y al medio de cultivo que se empleó en su multiplicación para ambas investigaciones. El medio de cultivo que se utiliza en la producción de Azofert® (9) es un medio rico en nutrientes que difiere de la composición química del medio LM (28).

La cepa CF1 en el inoculante disminuyó su concentración en una unidad logarítmica a los 30, 120 y 180 días de conservación a temperatura ambiente. Otras investigaciones con inoculantes líquidos de *Bradyrhizobium japonicum* mostraron este mismo comportamiento a los 30 y 180 días de conservación a 27-29 °C (29). Al final del ensayo, a los 180 días a temperatura ambiente, la cepa CF1 en Azofert®-F mostró valores de concentración celular de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. A diferencia de otros autores que informaron que cepas de *Pseudomonas* a 28±2 °C no sobrevivieron en el inoculante luego de 150 días de conservación (30).

Los resultados muestran que la temperatura y el tiempo afectan la estabilidad microbiológica de Azofert®-F. Se conoce que la temperatura, el tipo de formulación y el tiempo de almacenamiento tienen un efecto significativo en la viabilidad celular del ingrediente activo de los inoculantes (31). Temperaturas bajas enlentecen procesos fisiológicos de la célula bacteriana y su envejecimiento (32), mientras que temperaturas próximas a 30 °C aumentan el consumo de los nutrientes del medio por la bacteria, lo que provoca el agotamiento más acelerado de estos y con ello la disminución de la viabilidad celular (33).

Conocer la vida útil del bioproducto Azofert®-F, en las condiciones de almacenamiento disponibles en el país, permite establecer una estrategia de producción que cubra la mayor demanda posible del producto, con disponibilidad suficiente en el momento de la siembra del frijol en Cuba.



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

**Figura 1.** Concentración de la cepa *Rhizobium leguminosarum* CF1 en el biofertilizante Azofert®-F, almacenado a 4 °C y 29±2 °C, durante 180 días

La temperatura y el tiempo de conservación influyen en la actividad biológica de Azofert®-F en plantas de frijol, cultivar Tazumal

Pocos estudios evalúan el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la actividad biológica de los inoculantes a base de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Esta constituye la primera investigación en Cuba que aborda esta temática en un inoculante comercial para el frijol, uno de los cultivos más importantes para los cubanos.

El análisis de los datos provenientes del ensayo de inoculación, en condiciones controladas, mostró que hubo interacción entre los factores temperatura y tiempo en las variables masa seca de nódulos, raíces y parte aérea de las plantas de frijol. En el resto de las variables no hubo interacción entre ambos factores (Tabla 2).

Las plantas que se trataron con los inóculos bacterianos que poseían 40 días de conservación a 29±2 °C, manifestaron los resultados más favorables en la masa seca de nódulos, lo que indica un mayor contenido de bacteroides establecidos en ellos. La masa seca de raíz y parte aérea, se favoreció con la aplicación de inoculantes conservados durante 40 días a 4 °C (Tabla 3). Es lógico que en el menor tiempo evaluado se encuentre la mayor

**Tabla 2.** Factores y términos de la interacción en el análisis de ANOVA para las variables de nodulación y crecimiento de plantas de frijol cultivar Tazumal, en condiciones controladas

Origen	Número de nódulos totales (u)	Número de nódulos efectivos totales (u)	Masa seca de nódulos totales (g)	Masa seca de raíces (g)	Masa seca parte aérea (g)	Contenido relativo de clorofilas totales (SPAD)
Modelo corregido	0,152	0,079	0,000	0,000	0,000	0,002
Intersección	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<sup>a</sup> Temperatura	0,106	0,051	0,002	0,007	0,027	0,236
<sup>b</sup> Tiempo	0,511	0,282	0,000	0,003	0,000	0,000
<sup>c</sup> Temperatura-Tiempo	0,123	0,136	0,001*	0,007*	0,025*	0,634

<sup>a</sup>Factor Temperatura con dos niveles: 4 °C y 29±2 °C; <sup>b</sup>Factor tiempo con dos niveles: 40 y 120 días; <sup>c</sup>Efecto combinado de los factores Temperatura y Tiempo; (\*) Interacción entre los factores

actividad, ello se corresponde con los mayores valores de concentración celular hallados en los inoculantes: de  $10^8$  y  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Otras investigaciones informan que no se afecta la masa seca radical y de la parte aérea de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) y soya (*Glycine max* (L.)), cuando se tratan con inoculantes a base de rizobios que se conservaron por 15, 60, 120 y 180 días a 4 y  $28 \pm 2$  °C, y que posean una concentración de células de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> al momento de la inoculación de las semillas (33).

Por otra parte, los resultados mostraron que hubo una influencia del factor temperatura en el número de nódulos efectivos y del factor tiempo en el contenido relativo de clorofilas totales (Tabla 4).

La inoculación de Azofert®-F cuando se conservó a 4 °C provocó mayor número de nódulos efectivos en las plantas. Además, el empleo de los inoculantes que se conservaron por 40 días potenció el contenido relativo de clorofilas totales. Investigaciones previas mostraron similar efecto de Azofert®-F en el cultivar Cubacueto 25-9, a los siete días de su elaboración (34). Por lo tanto, esta investigación sugiere que el producto es capaz de mantener su actividad biológica en plantas 40 días después de su elaboración (Tabla 4).

La temperatura de conservación ni el tiempo de almacenamiento de los inoculantes influyeron en la formación de nódulos en las plantas de frijol, lo que pudiera deberse a que la capacidad de la cepa CF1 para establecer simbiosis con las plantas de frijol se mantuvo por un período de, al menos, 120 días en ambas condiciones. Estudios previos, con inoculantes a base de rizobios que se

almacenaron a 4 y  $28 \pm 2$  °C por 15, 60, 120 y 180 días, muestran un comportamiento similar en los cultivos de arveja y soya (33).

Otras investigaciones indican que la aplicación de inoculantes de *Bradyrhizobium* que se conservaron durante 180 días a 4 °C provocaron un incremento en el número de nódulos efectivos en plantas de soya respecto a aquellas donde se emplearon inóculos conservados a  $29 \pm 2$  °C (30). Además, inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* que se mantuvieron por un período de 180 días a  $28 \pm 2$  °C promovieron el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y disminuyeron el marchitamiento de las hojas por *Fusarium* (35).

El efecto positivo de la aplicación de Azofert®-F, conservado por 40 días, en el contenido de clorofilas se correspondió con los mejores resultados en la masa seca nodular y la masa seca de la parte aérea de las plantas de frijol (Tabla 3). En ese momento, el inoculante presentó una concentración elevada de la cepa CF1 ( $10^8$ - $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Una mayor concentración de la cepa en el inoculante propicia un mayor número de células en contacto con las raíces y, por lo tanto, se incrementarían los sitios de infección, la formación de los nódulos y el establecimiento de los bacteroides, lo que incrementa la masa nodular. Un incremento de la nodulación efectiva en la FBN permite un mayor aporte de nitrógeno (36), lo que conllevaría al incremento de los pigmentos fotosintéticos y de la biomasa aérea. Estas evidencias se corroboraron en investigaciones previas con frijol caupí (*Vigna unguiculata* L.), frijol común, soya y canavalia (*Canavalia ensiformis*) (8, 11, 37, 38).

**Tabla 3.** Efecto de la combinación de los factores Temperatura y Tiempo de conservación del inoculante Azofert®-F sobre las variables de nodulación y crecimiento de las plantas de frijol que mostraron interacción

Tratamientos		Masa seca nodular (g)	Masa seca de raíces (g)	Masa seca parte aérea (g)
Temperatura (°C)	Tiempo (días)			
4	40	0,033 ± 0,006 b	1,23 ± 0,32 a	1,08 ± 0,05 a
	120	0,022 ± 0,002 b	0,18 ± 0,02 b	0,40 ± 0,05 c
29±2	40	0,074 ± 0,006 a	0,24 ± 0,02 b	0,82 ± 0,05 b
	120	0,019 ± 0,005 b	0,17 ± 0,02 b	0,40 ± 0,04 c
Esx		0,008	0,22	0,07

Los datos muestran las medias + error estándar de la media. Letras iguales en la misma columna muestran diferencias significativas (Tukey HSD  $p < 0,05$ ,  $n=5$ )

**Tabla 4.** Efecto independiente de los factores Temperatura y Tiempo de conservación del inoculante Azofert®-F sobre las variables que no mostraron interacción

Tratamientos	Número de nódulos totales (u)	Número de nódulos efectivos (u)	Contenido relativo de clorofilas totales (SPAD)
		<b>Temperatura (°C)</b>	
4	31,1 ± 3,6 a	29,1 ± 3,8 a	27,6 ± 1,4 a
29±2	23,2 ± 3,1 a	19,8 ± 2,6 b	29,1 ± 1,2 a
		<b>Tiempo (días)</b>	
40	25,6 ± 2,1 a	22,0 ± 1,7 a	31,3 ± 0,9 a
120	28,7 ± 4,6 a	26,9 ± 4,7 a	25,4 ± 0,8 b

Los datos muestran las medias + error estándar de la media. Letras iguales en la misma columna muestran diferencias significativas (Tukey HSD  $p < 0,05$ ,  $n=5$ )



## CONCLUSIONES

- Se demostró que el inoculante Azofert®-F pudiera conservarse a 4 y 29±2 °C, por 150 y 90 días, respectivamente; sin necesidad de preservantes en su formación y que hasta los 120 días de conservación no afecta la formación de nódulos en las plantas de frijol. Estas evidencias permitirían establecer una estrategia de producción y comercialización del inoculante con calidad adecuada durante todo el año, que asegure cubrir las demandas del producto, fundamentalmente en la época de siembra.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ganesan K, Xu B. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Their Health Benefits. *Int J Mol Sci*. 2017 Nov 4;18(11):2331. DOI: [10.3390/ijms18112331](https://doi.org/10.3390/ijms18112331). PMID: 29113078. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5713300/>.
2. Guevara AM, Moya KV, Zeledón JR, Rojas LG, Aguirre CH, Monge HB. Evaluación de propiedades fisicoquímicas del frijol costarricense (*Phaseolus vulgaris*) como estrategia de diferenciación y valorización. *Perspect Rur Nueva Época*. 2020 Jun 30;18(35):25-48. DOI: [10.15359/prne.18-35.2](https://doi.org/10.15359/prne.18-35.2). [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/perspectivasrurales/article/view/14787>.
3. Cantaro-Segura H, Huaranga-Joaquín A, Zúñiga-Dávil D. Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia (Arica)*. 2019 Dec;37(4):73-81. DOI: [10.4067/S0718-34292019000400073](https://doi.org/10.4067/S0718-34292019000400073). [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0718-34292019000400073&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-34292019000400073&lng=es&nrm=iso&tlng=es).
4. López-Alcocer JJ, Lépiz-Ildefonso R, González-Eguiarte DR, Rodríguez-Macías R, López-Alcocer E. Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* recolectadas en frijol cultivado y silvestre. *Rev Terra Latinoam*. 2020 Oct 11;38(4):841-852. DOI: [10.29312/terralat.38.4.654](https://doi.org/10.29312/terralat.38.4.654). [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.terralatinoamericana.org.mx/index.php/terra/article/view/654>.
5. Martínez F, García C, Gómez LA, Aguilar Y, Martínez-Viera R, Castellanos N, Riverol M. Manejo sostenible de suelos en la agricultura cubana. *Agroecología*. 2017;12(1):25-38. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/330321>.
6. Buntić AV, Stajković-Srbinović OS, Knežević MM, Kuzmanović ĐŽ, Rasulić NV, Delić DI. Development of liquid rhizobial inoculants and pre-inoculation of alfalfa seeds. *Arch Biol Sci*. 2019 Jun 4;71(2):379-387. DOI: [10.2298/ABS19023503B](https://doi.org/10.2298/ABS19023503B). [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.serbiosoc.org.rs/arch/index.php/abs/article/view/3503>.
7. Romero-Arias A, Ruz-Reyes RM, Nápoles-García MC, Gómez-Padilla EJ, Rodríguez-Rodríguez S. Efecto de la aplicación de tres cepas de *Bradyrhizobium* en el desarrollo morfoagronómico de *Glycine max* Pastos y Forrajes. 2019;42(4):290-295. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/2691/269162670006/>
8. Padilla EG, Ruiz-Díez B, Fajardo S, Eichler-Loebermann B, Samson R, Damme PV, Sánchez RL, Fernández-Pascual M. Caracterización de rizobios aislados de nódulos de frijol caupí, en suelos salinos de Cuba. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(4):39-49. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1401>.
9. Nápoles MC, Gómez G, Costales D. Factores de nodulación. Experiencia en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 2008;29(2):71-80. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/254>.
10. Hernández Salido L, Salido García Y. Influencia de la aplicación de Azofert inoculante a base *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) VAR. Delicias 364 en finca Juan Sáez. Manatí. *Carib Cienc Soc*. 2019 Jan 30. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/caribe/2019/01/cultivo-frijol-comun.html>.
11. Estrada Prado W, Chávez Suárez L, Jerez Mompie E, Nápoles García MC, Maceo Ramos YC, Cordoví Domínguez C. Efecto del Azofert® en el rendimiento de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en condiciones de déficit hídrico. *Revista Ciencias Agrícolas*. 2018;45(4): [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/html/v45n4/body/cag03418.html>.
12. Bernabeu P. Caracterización de la colonización y promoción del crecimiento vegetal por *Burkholderia tropica* en gramíneas [en línea] [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina; 2017. p. 264. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/59824>.
13. Izaguirre-Mayoral ML. Biofertilizantes en Iberoamérica: Una Visión Técnica, Científica y Empresarial [en línea]. 1ra ed. Montevideo, Uruguay: Editorial Universitaria; 2007. p. 103. Disponible en: [https://books.google.com/cu/books/about/Biofertilizantes\\_en\\_Iberoam%C3%A9rica.html?id=BrnhtAEACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com/cu/books/about/Biofertilizantes_en_Iberoam%C3%A9rica.html?id=BrnhtAEACAAJ&redir_esc=y).
14. Hungria M, Nogueira MA, Campos LJM, Menna P, Brandi F, Ramos YG. Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. *Agronomy Journal*. 2020;112(6):5222-5236. DOI [10.1002/agj2.20392](https://doi.org/10.1002/agj2.20392) [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/agj2.20392>.
15. Dibut B, González R, Martínez R. Dimargon, nuevo medio de cultivo para la producción industrial de biopreparados a base de *Azotobacter chroococcum*. *Cultivos Tropicales*.

- 1994;15(1):12-14. [Consultado: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/cultivos-tropicales/articulo/dimargon-nuevo-medio-de-cultivo-para-la-produccion-industrial-de-biopreparados-a-base-de-azotobacter-chroococcum>.
16. Ortega García M, Shagarodsky Scull T, Ríos Rocaful Y, Dibut Alvarez B, Torres Gómez de Cádiz DC. Nueva variante de reproducción de *Mesorhizobium* para la biofertilización del cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L). Revista de Agrotecnia. 2014;38(1):87-93. Disponible en: [https://www.grupoagricoladecuba.gag.cu/media/Agrotecnia/pdf/38\\_2014/1/8.pdf](https://www.grupoagricoladecuba.gag.cu/media/Agrotecnia/pdf/38_2014/1/8.pdf).
  17. Nápoles MC, Velazco A. Utilización del ácido ascórbico como preservante en biopreparados de *Azospirillum brasilense*. Cultivos Tropicales. 1994;15(2):25-27. Disponible en: <https://ediciones.inca.edu.cu/files/antiores/1994/2/CT15205.pdf>.
  18. Menéndez C, Trujillo LE, Ramírez R, González-Peña D, Espinosa D, Enríquez GA, Hernández L. Producción de un inoculante líquido de *Bradyrhizobium japonicum* con alto impacto en la siembra mecanizada de la soya en Cuba. Biotecnología Aplicada. 2014;31(2):111-115. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=51730>.
  19. Vincent JM. A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria [en línea]. 1970. Blackwell Scientific. p. 202. ISBN 978-0-632-06410-6. Disponible en: [https://books.google.com/cu/books/about/A\\_Manual\\_for\\_the\\_Practical\\_Study\\_of\\_Root.html?id=dcQcAQAAIAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com/cu/books/about/A_Manual_for_the_Practical_Study_of_Root.html?id=dcQcAQAAIAAJ&redir_esc=y).
  20. López-Alcocer JJ, Lépiz-Ildelfonso R, González-Eguiarte DR, Rodríguez-Macias R, López-Alcocer E, Olalde-Portugal V. Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. Revista Fitotecnia Mexicana. 2017;40(1):73-81. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/610/61051194009/html/>.
  21. Hernández Jiménez A, Bosch Infante D, Pérez Jiménez JM, Castro Speck N. Clasificación de los suelos de Cuba 2015 [Internet]. 1.a ed. San José de las Lajas (Cuba): Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; 2015. ISBN 978-959-7023-77-7. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://isbn.cloud/9789597023777/clasificacion-de-los-suelos-de-cuba-2015/>.
  22. Paneque P, Calaña N, Calderón V, Borges B, Hernández G, Caruncho C. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos [Internet]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas; 2010. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://docplayer.es/13119861-Manual-de-tecnicas-analiticas-para-analisis-de-suelo-foliar-abonos-organicos-y-fertilizantes-quimicos.html>.
  23. Mesa N, Naranjo G, Cancio R, Martí A, Clemente B, Suárez O. Manual de interpretación de los índices físico-químicos y morfológicos de los suelos cubanos. 2da ed. 1984. p. 136. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/44495794\\_Manual\\_de\\_interpretacion\\_de\\_los\\_indices\\_fisico-quimicos\\_y\\_morfologicos\\_de\\_los\\_suelos\\_cubanos\\_Dir\\_eccion\\_General\\_de\\_Suelos\\_y\\_Fertilizantes](https://www.researchgate.net/publication/44495794_Manual_de_interpretacion_de_los_indices_fisico-quimicos_y_morfologicos_de_los_suelos_cubanos_Dir_eccion_General_de_Suelos_y_Fertilizantes).
  24. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. 1950. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>.
  25. Morote C, Palomino M. Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y producción de inoculantes. Investigación. 2019;27:175-195. ISSN 1684-0089. DOI 10.51440/unsch.revistainvestigacion.2019.1.119. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/348427975\\_Tecnicas\\_de\\_aislamiento\\_identificacion\\_seleccion\\_de\\_cepas\\_de\\_Rhizobium\\_Azospirillum\\_y\\_produccion\\_de\\_inoculantes](https://www.researchgate.net/publication/348427975_Tecnicas_de_aislamiento_identificacion_seleccion_de_cepas_de_Rhizobium_Azospirillum_y_produccion_de_inoculantes).
  26. Hungria M, Nogueira M. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: Mitos, verdades e desafios. Boletim de Pesquisa. 2020. pp. 50-62. ISBN 2176-2902. Disponible en: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/223209/1/SP-17-2020-online-1.pdf>.
  27. Tarek R, Dayal TR, Kaur BS, Danielle P. Development of Efficient Suspension Formulation of Starch Industry Wastewater Grown *Sinorhizobium Meliloti* for Agricultural Use. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2014;3(4):1083-1093. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Tarek-Rouissi/publication/274961111\\_Development\\_of\\_Efficient\\_Suspension\\_Formulation\\_of\\_Starch\\_Industry\\_Wastewater\\_Grown\\_Sinorhizobium\\_Meliloti\\_for\\_Agricultural\\_Use/links/552d98760cf21acb0921786b/Development-of-Efficient-Suspension-Formulation-of-Starch-Industry-Wastewater-Grown-Sinorhizobium-Meliloti-for-Agricultural-Use.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Tarek-Rouissi/publication/274961111_Development_of_Efficient_Suspension_Formulation_of_Starch_Industry_Wastewater_Grown_Sinorhizobium_Meliloti_for_Agricultural_Use/links/552d98760cf21acb0921786b/Development-of-Efficient-Suspension-Formulation-of-Starch-Industry-Wastewater-Grown-Sinorhizobium-Meliloti-for-Agricultural-Use.pdf).
  28. Nápoles MC, Martínez J, Costales D, Gómez G. Efecto de diferentes medios de cultivo. Cultivos Tropicales. 2006;27(1):35-38. ISSN 0258-5936. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215885006.pdf>.
  29. Cozzi JG, Benintende BG, Pacheco Basurco JC. Nuevo inoculante líquido para semillas de soja (*Glycine max*). Rev. Facultad de Agronomía. 1996;16:127-132. Disponible en: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/revista/facultadagronomia/1996cozzijg.pdf>.
  30. Praveen Biradar BJ, Santhosh GP. Cell Protectants, Adjuvants, Surfactant and Preservative and their Role in Increasing the Shelf Life of Liquid Inoculant Formulations of *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Pure & Applied Bioscience. 2018;16(4). Disponible en: <http://www.ijpab.com/vol6-iss4a15.php>.
  31. Infante EJG. Modelo factorial para el control de calidad de biofertilizantes de importancia agrícola. 2017; p. 40. Disponible en: <https://repository.libertadores.edu.co/bitstream/handle/11371/1318/gonzalezedgar2017.pdf?sequence=1>.
  32. Freire J, Sato M. Conservación de cultivos de rizobios. Revista Latinoamericana de Microbiología. 1999;41(1):35-42. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=YTaaAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA35&ots=eivT\\_nsYnh&sig=YmqeEdfnGuskQ3w-il7Fb\\_GlyAU#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=YTaaAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA35&ots=eivT_nsYnh&sig=YmqeEdfnGuskQ3w-il7Fb_GlyAU#v=onepage&q&f=false).

33. Moreno Conn LM, Pérez A, Ramírez M, Franco M. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológicos para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). Rev. colomb. biotecnol. 2014;45-56. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752014000200006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752014000200006).
34. Estrada. Efecto del Azofert® en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) sometidas a dos regímenes de riego. Centro Agrícola. 2018;45(4):20-26. ISBN 0253-5785. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852018000400020](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852018000400020).
35. Department of Agricultural Microbiology, College of Agriculture, Bheemarayangudi, University of Agricultural Sciences, Raichur, 584104 (Karnataka) y Biradar BJP. Role of Polymeric Additives in Formulation, Shelf-life and Bioefficacy of Liquid Inoculant of *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Pure & Applied Bioscience. 2018;6(4):123-133. ISSN 23207051. DOI 10.18782/2320-7051.6822. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://www.ijpab.com/vol6-iss4a16.php>.
36. Koskey G, Mburu SW, Njeru EM, Kimiti JM, Ombori O, Maingi JM. Potential of Native Rhizobia in Enhancing Nitrogen Fixation and Yields of Climbing Beans (*Phaseolus vulgaris*) in Contrasting Environments of Eastern Kenya. Frontiers in Plant Science. 2017;8:443. ISSN 1664-462X. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00443>.
37. Sauvu-Jonasse C, Nápoles-García M, Falcón-Rodríguez A, Lamz-Piedra A, Ruiz-Sánchez M. Bioestimulantes en el crecimiento y rendimiento de soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Cultivos Tropicales. 2020;41(3). ISSN 0258-5936. Disponible en: <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1556>.
38. Alonso GMM, Aguilar YT, Forte IH, Nualles MV, Araujo E da S. Cuantificación de la fijación biológica de nitrógeno en *Canavalia ensiformis* crecida en un suelo pardo mullido carbonatado mediante los métodos de abundancia natural de <sup>15</sup>N y diferencia de N total. Cultivos Tropicales. 2017;38(1):122-130. ISSN 1819-4087. [Consultado: 18 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193250540016>.