



INFLUENCIA DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN EN LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y METABÓLICAS DE CEPAS DE *AZOTOBACTER* SP.

Influence of the conservation method on morphological and metabolic characteristics of *Azotobacter* sp. strains

✉ Yoania Ríos Rocafull^{1*}, ✉ Marisel Ortega García², ✉ Beatriz Ramos García¹, ✉ Bernardo Dibut Álvarez¹

¹Departamento de Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 188 No. 38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, Boyeros. La Habana, Cuba. E-mail: labhongo4@inifat.co.cu, biofertilizantes@inifat.co.cu

²Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 188 No. 38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, Boyeros. La Habana, Cuba. E-mail: dir_cientifica@inifat.co.cu

RESUMEN: El género *Azotobacter* se destaca por presentar características como promotor del crecimiento vegetal, las que pueden ser afectadas si no se cuenta con una adecuada conservación de sus cepas. No todas las instituciones tienen a su disposición métodos de conservación a largo plazo; es por ello, que el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de alternativas de preservación en características morfológicas y metabólicas de tres cepas de este género bacteriano. Los microorganismos se conservaron en agua destilada a 5 °C y en glicerol al 30 % a -20 °C de temperatura. Después de un año, las tres cepas mantuvieron sus características culturales y morfotintoriales, aunque las que fueron conservadas en agua presentaron menos biomasa. Las cepas también mostraron potencial para fijar nitrógeno atmosférico y liberar compuestos indólicos. La producción de enzimas líticas (amilasas, proteasas y lipasas) fue diferente para cada microorganismo, pero solo para la cepa INIFAT-20 dependió del método de conservación. Por su actividad antagonista frente a *Fusarium chlamydosporum* y *Alternaria* sp. se destacó la cepa INIFAT-12, aunque para el segundo patógeno también sobresalió la cepa INIFAT-20, siempre con un mejor resultado para la cepa conservada en agua destilada estéril. Se demostró el potencial estimulador del crecimiento del género en el cultivo del tomate, aunque indicadores como la longitud de la raíz y el diámetro del tallo mostraron diferencias en dependencia de la conservación para las cepas INIFAT-21 e INIFAT-12, respectivamente. En conclusión, el método de conservación influyó en las características morfológicas y la acción estimuladora del crecimiento de cepas *Azotobacter*, siendo posible conservar estas -20 °C de temperatura utilizando glicerol al 30 % como agente crioprotector durante un año con buenos resultados en cuanto a su estabilidad como promotoras del crecimiento vegetal.

Palabras clave: bacterias, mantenimiento a mediano plazo.

ABSTRACT: The genus *Azotobacter* is notable for exhibiting characteristics as a plant growth promoter, which can be affected if its strains are not properly preserved. Not all institutions have access to long-term conservation methods; therefore, the present study aimed to evaluate the effect of preservation alternatives on the morphological and metabolic characteristics of three strains of this bacterial genus. The microorganisms were preserved in distilled water at 5°C and in 30% glycerol at -20 °C. After one year, the three strains maintained their cultural and morphotintorial characteristics, although those preserved in water showed less biomass. The strains also demonstrated potential for atmospheric nitrogen fixation and the release of indolic compounds.

*Correspondencia a: yrocafull@gmail.com

Recibido: 27/05/2025

Aceptado: 16/08/2025

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de los autores: Yoania Ríos Rocafull: **Conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, administración de proyectos, escritura-revisión y edición.** Marisel Ortega García: **Investigación, metodología, escritura-revisión y edición.** Beatriz Ramos García: **Metodología.** Bernardo Dibut Álvarez: **Escritura-revisión y edición.**



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/>



The production of lytic enzymes (amylases, proteases, and lipases) differed for each microorganism, but only for the INIFAT-20 strain it depended on the conservation method. Due to its antagonistic activity against *Fusarium chlamydosporum* and *Alternaria* sp., strain INIFAT-12 stood out, although for the second pathogen strain INIFAT-20 also stood out, always with better results for the strain preserved in sterile distilled water. The growth-stimulating potential of the genus in tomato cultivation was demonstrated, although indicators such as root length and stem diameter showed differences depending on the preservation method for strains INIFAT-21 and INIFAT-12, respectively. In conclusion, the conservation method influences the morphological characteristics and growth-promoting action of *Azotobacter* strains, making it possible to preserve them at -20 °C using 30 % glycerol as a cryoprotectant for one year with good results in terms of their stability as plant growth promoters.

Key words: bacteria, medium-term conservation.

INTRODUCCIÓN

El género *Azotobacter* se destaca por su potencial para estimular el crecimiento de las plantas, por lo que a nivel mundial se han desarrollado diferentes biofertilizantes comerciales a partir de cepas de este microorganismo, que han sido utilizados para aumentar el rendimiento de hortalizas, granos, pastos y frutales (Martínez y Dibut, 2012; Aasfar et al., 2021).

La conservación de las cepas, que constituyen los principios activos de estos bioproductos, es fundamental para garantizar su efectividad. Internacionalmente, se utilizan diferentes métodos de conservación, destacándose por su efectividad la liofilización, la criopreservación y la ultracongelación (Quintero-Rodríguez et al., 2023). Sin embargo, no todos los centros cuentan con el equipamiento necesario para conservar a largo plazo sus cepas por estos métodos. Cuba no está exenta de esta situación, la cual se agrava dado que no existe un centro que se encargue de mantener la viabilidad y estabilidad genética y metabólica de los microorganismos que se utilizan para el desarrollo de los biofertilizantes en la agricultura.

En la literatura se describen métodos alternativos para conservar los microorganismos. Destacan dentro de ellos la suspensión en agua destilada estéril, en capa de aceite mineral, la desecación en papel de filtro, suelo, arena, sílicagel, entre otros (Pérez-Rodríguez et al., 2021). A partir de estas referencias, el presente estudio se propuso como objetivo evaluar el efecto de dos métodos de conservación a mediano plazo en las características morfológicas y metabólicas de cepas de *Azotobacter* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos: Se utilizaron tres cepas de *Azotobacter* de la Colección de Bacterias Beneficiosas del INIFAT, cuya procedencia se muestra en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Procedencia de las cepas de *Azotobacter* utilizadas en el estudio.

Cepa	Procedencia
INIFAT-12	Suelo Ferralítico Rojo. Municipio Güira de Melena. Provincia Artemisa
INIFAT-20	Suelo Ferralítico Rojo. Municipio Güira de Melena. Provincia Artemisa
INIFAT-21	Suelo Ferralíticos Rojo. Boyeros. Provincia La Habana

Proceso de conservación: las cepas se revitalizaron mediante siembras por agotamiento en placas *Petri* de 90 mm, con medio de cultivo Asbhy sin nitrógeno (Martínez et al., 2006). Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C, y una vez crecidos los microorganismos se procedió a su conservación en agua destilada y glicerol. Para ambos casos, se tomó una muestra de la biomasa bacteriana que se adicionó en viales con 1 mL de agua destilada o glicerol al 30 %, según el método a utilizar. Se homogenizó y selló con parafina. Posteriormente, la muestra suspendida en agua destilada se colocó a 5 °C; mientras que la que se contenía glicerol se colocó a -20 °C de temperatura.

Evaluación de la pureza y viabilidad: después de un año se evaluó la pureza y la viabilidad de las cepas conservadas. Para ello, se tomó muestra de los viales las que fueron inoculadas en el medio de cultivo sólido Asbhy sin nitrógeno (Martínez et al., 2006).

Se incubó (48 h, a 30 °C), y seguidamente, se describió la morfología de las colonias y los caracteres morfotintoriales de las cepas mediante una tinción de Gram (Madigan *et al.*, 2018) y de manera cualitativa, el crecimiento bacteriano (+ crecimiento abundante y +/- poco crecimiento).

Evaluación de potencial estimulador del crecimiento vegetal: después de un año de conservación se determinó en las cepas la presencia de mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal. En el primer caso se incluyó el potencial para fijar nitrógeno atmosférico (FBN), solubilizar fosfato de calcio y producir compuestos indólicos del tipo ácido indol acético. Para la FBN, una muestra del material conservado se inoculó en el medio de cultivo sólido Asbhy carente de nitrógeno combinado (Martínez *et al.*, 2006). El crecimiento bacteriano después del periodo de incubación (48 h, a 30 °C) se consideró una respuesta positiva. Para evaluar la solubilización de fosfato de calcio, se utilizó el medio de cultivo NBRIP sólido (Nautiyal, 1999), tomando como respuesta positiva la formación de un halo alrededor de la colonia bacteriana. Para la producción de compuestos indólicos, las bacterias se inocularon en el medio de cultivo Agar Triptona Soya (BioCen) y se incubaron para su crecimiento (48 h, a 30 °C); posteriormente, se adicionó a las placas 5 mL del reactivo de Salkowski y se incubó por 30 min en condiciones de oscuridad. La aparición de una zona rosada alrededor de la colonia indicó la liberación de este tipo de compuestos por parte del microorganismo.

Como mecanismos indirectos de estimulación se evaluó la liberación de enzimas líticas y la actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos. Para valorar la liberación de enzimas amilasas, proteasas y lipasas se utilizaron los métodos y medios de cultivo descritos por Cruz Cárdenas *et al.* (2021), y se calculó el radio de hidrólisis, mediante la relación entre el halo formado alrededor de la colonia bacteriana y el tamaño de esta (Sánchez *et al.*, 2020). El efecto antagonista se determinó por el método de Cultivo Dual (Vera Loor *et al.*, 2020). Se utilizaron los patógenos *Fusarium chlamydosporum* (cepa 2022) y *Alternaria* sp. (cepa 3403) procedentes de la Colección de Cultivos Puros de Hongos del INIFAT. Las cepas bacterianas se inocularon de manera independiente, a 4 cm del borde de la placa *Petri* con el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)

(BioCen), mientras que en borde equidistante se colocó un disco de 5 mm del patógeno previamente crecido en este mismo medio de cultivo. Tras siete días de incubación a 30 °C se midió el diámetro del micelio fúngico tanto en las placas inoculadas con las bacterias como en las placas Testigos, donde solamente se inoculó el hongo. Con esos datos se calculó el porcentaje de inhibición micelial ($IM = ((di-dt)/dt)*100$; donde di: diámetro del micelio fúngico en las placas inoculadas y dt: diámetro del micelio fúngico en las placas testigo) (Vera Loor *et al.*, 2020).

Por último, se evaluó el efecto de la aplicación de las tres cepas de *Azotobacter* después de un año de conservación sobre plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). El contenido de los viales se adicionó en erlenmeyers con 50 mL de Caldo Triptona Soya (BioCen). Estos se colocaron en una zaranda (Labolan) a 110 r.p.m de agitación, 30 °C de temperatura, durante 48 h. El ensayo se realizó en condiciones semicontroladas (casa de cristal), en cepellones de 45 alveolos con suelo Ferralítico Rojo Lixiviado agrogénico (Hernández *et al.*, 2020) donde se sembraron las semillas de tomate cv V8, procedentes del Banco de Germoplasma Central de Cuba, ubicado en el INIFAT. Los productos obtenidos a partir de la multiplicación de las bacterias se aplicaron directamente al suelo, a razón de 25 mL por cepellón. Se dio seguimiento diario al crecimiento de las plántulas, las que se extrajeron a los 20 días para evaluar la altura de las mismas y la longitud de la raíz (ambos medidos con una regla graduada (cm), diámetro del tallo (mm) (medido con un pie de rey digital, 0.05 mm de error), número de hojas (u) y masa fresca de la plántula (g). Para esto último, las muestras se pesaron en una balanza semianalítica marca Nahita (error 0,01 g).

Diseño experimental y procesamiento estadístico: todos los experimentos se realizaron bajo un Diseño Completamente Aleatorizado. Contaron con dos réplicas y tres repeticiones, a excepción del ensayo con planta donde se utilizaron 15 plántulas por tratamiento. Para el procesamiento estadístico primero se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas con las pruebas de Cochran C (1941), Bartlett (1937) y Hartley (1950); y posteriormente, se realizaron Análisis de Varianza. Las medias se compararon mediante una Prueba de Duncan (Lerch, 1977) (5 % de probabilidad de error).



Se utilizó el programa STATGRAPHICS *Plus* versión 5.0 (STATGRAPHICS *Plus* versión 5.0, Online Manual, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la pureza y viabilidad de los microorganismos

Las tres cepas de *Azotobacter* se mantuvieron viables después de un año de conservación, tanto en agua destilada estéril a 5 °C, como en glicerol al 30 % a -20 °C de temperatura. En la [Tabla 2](#) se pueden observar las características culturales (morfología de las colonias) y morfotintoriales de los microorganismos al concluir el periodo de conservación, así como los resultados de la evaluación cualitativa de su crecimiento en el medio de cultivo Asbhy sin nitrógeno.

La morfología de las tres cepas coincide con la descrita para el género *Azotobacter* en otras investigaciones ([Zavala et al., 2020](#)). La literatura destaca como una de las características de este grupo bacteriano la formación de quistes que le permiten resistir condiciones ambientales adversas ([Pavone, 2022](#)), elemento que pudo influir en el mantenimiento de la viabilidad y los caracteres morfológicos de estos microorganismos. En este sentido, se deben resaltar los resultados de una investigación anterior, donde estas tres cepas de *Azotobacter* toleraron condiciones de sequía,

salinidad, variaciones de pH y temperatura ([Ríos et al., 2024](#)), aspecto que se asoció a la presencia de dichas estructuras.

Evaluación de potencial estimulador del crecimiento vegetal de los microorganismos

Las cepas de *Azotobacter* conservadas durante un año tanto en agua destilada estéril a 5 °C como en glicerol al 30 % a -20 °C presentaron potencial para realizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno al crecer en el medio de cultivo Asbhy carente de este nutriente. También mostraron resultados positivos para la producción de compuestos indólicos del tipo ácido indol acético, aunque ninguna solubilizó fosfato de calcio ([Tabla 3](#)).

La fijación biológica de nitrógeno y la producción de compuestos indólicos como el ácido indol acético son mecanismos de estimulación del crecimiento descritos para el género *Azotobacter* ([Sumbul et al., 2020](#)) a los cuales se han asociado de manera histórica los beneficios que muestran los cultivos por la aplicación de la bacteria. En el caso de la solubilización de fosfatos, aunque autores como [Pavone \(2022\)](#) y [Zavala et al. \(2020\)](#) alcanzaron resultados positivos, no es uno de los atributos más comunes de este grupo bacteriano; y en particular, para las cepas en estudio ya se habían obtenido resultados negativos en investigaciones precedentes ([Ríos et al., 2024](#)).

Tabla 2. Características morfológicas de tres cepas de *Azotobacter* (INIFAT-12, INIFAT-20 e INIFAT-21) después de un año de conservación

Tratamientos	Caracteres culturales (medio de cultivo Asbhy sin nitrógeno)	Respuesta a la Tinción de Gram	Crecimiento (medio de cultivo Asbhy sin nitrógeno)
Agua destilada (5°C)	Forma circular, bordes enteros, superficie lisa, elevación convexa, traslúcida	Bacilos cortos Gram negativos	+/-
Glicerol al 30 % (-20°C)	Forma circular, bordes enteros, superficie lisa, elevación convexa, traslúcida	Bacilos cortos Gram negativos	+

Tabla 3. Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal evaluados para las tres cepas de *Azotobacter* después de un año de conservación

Cepa	Método de conservación	Fijación biológica de nitrógeno atmosférico	Solubilización de fósforo	Producción de compuestos indólicos
INIFAT-12	Agua (5°C)	+	-	+
	Glicerol 30% (-20°C)	+	-	+
INIFAT-20	Agua (5°C)	+	-	+
	Glicerol 30% (-20°C)	+	-	+
INIFAT-21	Agua (5°C)	+	-	+
	Glicerol 30% (-20°C)	+	-	+

Los mecanismos involucrados en el proceso de solubilización para *Azotobacter* se encuentran en discusión. Sin embargo, se destaca dentro de las posibles propuestas, la producción de ácidos orgánicos. La eficiencia del proceso depende de la cantidad y tipo de ácidos que libere la bacteria (Aasfar *et al.*, 2021), elementos que también pudieron limitar la respuesta de las tres cepas en estudio.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal establecen interacción con las plantas a través de mecanismos directos e indirectos. Dentro de los mecanismos directos se encuentran la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes y la producción de fitohormonas, mientras que los indirectos se asocian con el control de organismos patógenos (Moreno-Valencia *et al.*, 2023). En este sentido, como parte del estudio se evaluó para las tres cepas de *Azotobacter* después de un año de mantenidas bajo las condiciones de conservación, la producción de enzimas líticas y el efecto antagonista frente a patógenos fúngicos.

La producción de enzimas líticas fue diferente para todas las cepas (Figura 1 a), aunque solo se destacó la influencia del método de conservación para la INIFAT-20. La acción frente a los patógenos mostró diferencias significativas entre las bacterias para ambos patógenos. Frente a *Alternaria* sp, para todas las cepas y condiciones de conservación

el porcentaje de inhibición micelial fue mayor al 30 %, no así para *F. chlamyosporum*, donde solo superó este valor la cepa INIFAT-12 conservada en agua destilada estéril (Figura 1 b).

La producción de enzimas líticas por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se ha relacionado con su acción antagonista, debido al efecto de estos compuestos sobre las paredes celulares de los hongos (Blanco y Castro, 2021). Se debe destacar, que en estudios previos se demostró que estas tres cepas de *Azotobacter* liberan enzimas proteasas (Ríos *et al.*, 2024), característica que según los resultados aquí alcanzados se afecta para las cepas INIFAT-12 e INIFAT-21 con los métodos de conservación utilizados. Ello pudo incidir en su acción frente a los patógenos.

El método de conservación influyó en el efecto biocontrol solo para la cepa INIFAT-12 en los dos patógenos, y la cepa INIFAT-20 frente a *Alternaria* sp. No se encontró una relación directa entre estos resultados y la producción de enzimas líticas, lo que hace suponer que estas cepas presentan otros mecanismos de actividad antagonista. Al respecto, Pavone (2022) asoció la producción de sideróforos, sustancias antimicrobianas, toxinas y hormonas del crecimiento vegetal por parte de *Azotobacter* con su efecto biocontrol,

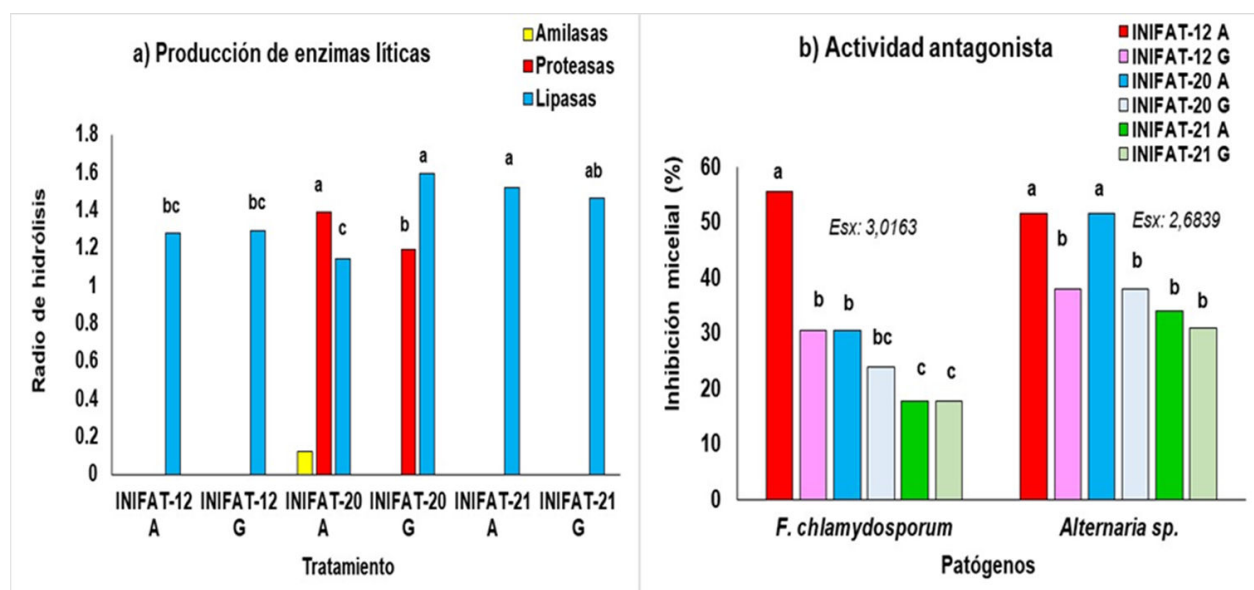


Figura 1. Mecanismos indirectos de estimulación del crecimiento en tres cepas de *Azotobacter* después de un año de conservación. Figura a) Medias con letras distintas difieren estadísticamente según prueba *t* de Student para enzimas proteasas ($t=2,4875$ $p=0,0473$) y Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para enzimas lipasas ($Esx=0,0727$). Figura b) Medias con letras distintas difieren significativamente para Prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Todas las pruebas a un 5 % de probabilidad de error. A: conservación en agua (5 °C); G: conservación en glicerol 30% (-20 °C)

mientras que Bolaños-Dircio *et al.* (2022) demostraron que la formación de quistes se relaciona de manera directa con la inhibición del crecimiento de patógenos como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Colletotrichum*. También se ha comprobado la acción biocontroladora de especies de *Azotobacter* frente a *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Curvularia* y *Helminthosporium* (Pavone, 2022), por tanto, este es un potencial que aunque menos abordado para el género, podría ser de gran interés en la búsqueda de bioproductos con un efecto integral sobre los cultivos.

La aplicación de los productos obtenidos a partir de las cepas de *Azotobacter* conservadas durante un año por los dos métodos evaluados en el estudio estimuló el crecimiento de las plántulas de tomate, en particular la altura de las posturas y la longitud de las raíces (Tabla 4).

El efecto marcado de *Azotobacter* sobre la altura de las posturas de tomate fue descrito también por autores como Pilatuña *et al.* (2021), quienes comprobaron que el 75 % de los aislados utilizados en su investigación ejercía una acción positiva sobre este indicador. Ello podría estar relacionado directamente con la producción de fitohormonas por parte de la bacteria, aspecto muy bien documentado para este género (Sumbul *et al.*, 2020).

La mejor respuesta de las variables de crecimiento se observó con la aplicación de la cepa INIFAT-12 mantenida en ambos métodos de conservación, microorganismo que al parecer es más eficiente que los restantes en su interacción con este cultivo. Sin embargo, se debe destacar la efectividad de las cepas

INIFAT-20 e INIFAT-21 conservadas en glicerol. En estas dos últimas, al parecer el método de conservación ejerce una mayor influencia en su acción estimuladora.

Existen diferentes métodos para la conservación de microorganismos. Estos se clasifican por su alcance en métodos a corto y a largo plazo. Dentro de los primeros, se encuentra la refrigeración, el subcultivo y el glicerol; mientras que los métodos a largo plazo incluyen el aceite mineral o la parafina líquida, el agua destilada, el suelo estéril, la sílica gel y otros más eficientes como la liofilización, la criopreservación, la encapsulación y el uso de nanopartículas. La selección de la variante a utilizar dependerá del microorganismo, el objetivo de la conservación y en especial, de las capacidades tecnológicas del laboratorio (Senaratne y Jayaweera, 2024). Es por ello, que evaluar alternativas económicas y de fácil implementación resulta muy importante, con el fin de mantener viables y estables genéticamente los microorganismos de interés aun cuando no se cuente con un equipamiento de avanzada para este fin.

El agua destilada y el glicerol tienen como ventaja un bajo costo y fácil implementación, pero en ambos casos se pueden presentar riesgos de contaminación, pérdida de viabilidad de los microorganismos, y alteraciones de sus características metabólicas (Senaratne y Jayaweera, 2024), de ahí que valorar su efectividad en cepas de interés es un aspecto importante para seleccionar la variante que permita alcanzar mejores resultados. En este sentido, se apreció que aunque la conservación con glicerol al 30 % implica la adquisición de un reactivo y la congelación del material biológico,

Tabla 4. Efecto de la aplicación de tres cepas de *Azotobacter* conservadas durante un año en agua destilada (5 °C) y glicerol al 30 % (-20°C) en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Número de hojas promedio (u)	Masa fresca (g)
INIFAT-12 A	5,52 b	0,84 ab	1,0 cd	0,6 ab	0,06 ab
INIFAT-12 G	6,08a	1,03 a	1,39 a	0,7 a	0,07 a
INIFAT-20 A	5,72 ab	0,88 ab	1,24 ab	0,3 bc	0,03 c
INIFAT-20 G	5,78 ab	0,70 b	1,23 ab	0,1 c	0,06 ab
INIFAT-21 A	5,97 ab	0,53 c	0,97 cd	0,1 c	0,05 bc
INIFAT-21 G	5,92 ab	0,70 b	1,12 bc	0,1 c	0,06 ab
Testigo	4,65 c	0,60 c	0,78 d	0,1 c	0,04 c
<i>Esx</i>	0,1917	0,0799	0,0805	0,1273	0,0062

Medias con letras distintas difieren significativamente para Prueba de Rangos Múltiples de Duncan a un 5 % de probabilidad de error. A: conservación en agua; G: conservación en glicerol

es un alternativa más adecuada que el agua destilada para mantener por al menos un año cepas de *Azotobacter* sp.

CONCLUSIONES

El método de conservación influye en las características morfológicas y la acción estimuladora del crecimiento de cepas *Azotobacter*, siendo posible conservar estas -20 °C de temperatura utilizando glicerol al 30 % como agente crioprotector durante un año con buenos resultados en cuanto a su estabilidad como promotoras del crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto "Desarrollo de una variante del biofertilizante DIMARGON como contribución al uso de medios biológicos para la producción de alimentos en Cuba (PS131LH004-00X19)", del Programa Sectorial de Ciencia, Tecnología e Innovación "Desarrollo y Uso Sostenible de Bioinsumos Agropecuarios y Medicamentos Veterinarios", por el soporte financiero para la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y. y Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Front. Microbiol*, 12:628379. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>.
- Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 160(901), 268-282. <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>
- Blanco, E. L. y Castro, Y. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana en el potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6-16. <http://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>.
- Bolaños-Dircio, A., Segura, D., Toribio-Jiménez, J., Toledo-Hernández, E., Ortuño-Pineda, C., Ortega-Acosta, S.A., Palemón-Alberto, F. y Romero-Ramírez, Y. (2022). Cysts and alkylresorcinols of *Azotobacter vinelandii* inhibit the growth of phytopathogenic fungi. *Chilean Journal of Agriculture Research*, 82(4). <http://doi.org/10.4067/S0718-58392022000400658>.
- Cochran, W. G. (1941) The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Eugenics*, 11: 47-52. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1941.tb02271.x>
- Cruz Cárdenas, C. I., Zelaya-Molina, L. X., Chávez-Díaz, I. F., Rojas-Anaya, E. y Arteaga-Garibay, R. I. (2021). Conservación de cepas microbianas para biofertilizantes. Libro teórico Núm. 02. Centro Nacional de Recursos Genéticos. Tepatitlán de Morelos. Jal. México. 90 pp.
- Hartley, H. O. (1950) The maximum F-ratio as a short-cut test for heterogeneity of variance. *Biometrika* 37, no. 3/4 (1950): 308-312.
- Hernández, A., Morales, M., Carnero, G., Hernández, Y., Terán, Z., Grandio, D., Bojórnes, J. I., Vargas, D., Bernal, A., Terry, E., González, P. J., Cabrera, J. A. y García, J. D. (2020). Nuevos resultados sobre el cambio de las propiedades de los suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados de la "Llanura Roja de la Habana". Ediciones INCA, 159, ISBN 978-959-7258-04-9.
- Lerch, G. (1977) La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. La Habana, Cuba: Editorial Científico-Técnica.
- Madigan, M. T., Bender, K.S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. y Sthal, D.A. (2018). *Brock biology of microorganisms*. Fifteenth Edition. Global Edition. 1058 p. ISBN: 07-0-13-426192-8.
- Martínez, R. y Dibut, B. (2012). Biofertilizantes bacterianos. Editorial Científico-Técnica. Instituto Cubano del Libro. ISBN 978-959-05-0659-8. 279 pp.
- Martínez, V. R., López, M., Brossard, F. M., Tejeda, G. G., Pereira, A. H., Parra, Z. C., Rodríguez, S. J. y Alba, A. (2006). Procedimientos para el estudio y fabricación de biofertilizantes bacterianos. Ed. INIA - Maracay. Venezuela, Serie B, No. 11,88 pp.
- Moreno-Valencia, F. D., Aguirre, K., Muñoz-Rojas, J. y Morales-García, Y. E. (2023). La urgencia de usar rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas para detener el cambio climático. *Alianzas y tendencias BUAP*, 8(30): i-xi. <http://doi.org/10.5281/zenodo.8062473>.
- Nautiyal, S. C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-275.



- Pavone, D. (2022). Azotobacter en la agricultura: una bacteria biofertilizante que protege a las plantas. TecnoVita. Disponible en: <http://tecno-vitaca.com>.
- Pérez-Rodríguez, M., Díaz-Pérez, Y., Oliva-Llanes, N., Díaz-García, D., Gómez-Santiesteban, E., San Juan-Rodríguez, A. N., León-Fernández, V. y Dopico-Ramírez, D. (2021). Evaluación de la efectividad de diferentes métodos de conservación para las cepas de *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5. *Icidca* sobre los derivados de la caña de azúcar, 55(1), 70-79.
- Pilatuña, M. F., González-Parra, M. M., Mero, M. E. y Risco, D. (2021). Evaluación agronómica de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelos andinos en plántulas de lechuga y tomate. *Investigación Agraria*, 23(1): 47-52. <http://dx.doi.org/10.18004/investig.agrar.2021.junio.2301680>.
- Quintero-Rodríguez, M. P., Montoya-Arango, D., Restrepo-Posada, D. C. y González-Gil, D. M. (2023). Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. *Biota Colombiana*24(2), e1127. <https://doi.org/10.21068/2539200X.1127>.
- Ríos, Y., Ramos, B. y Ortega, M. (2024). Potencial estimulador del crecimiento de cepas de *Azotobacter* aisladas de agroecosistemas cubanos. *Agrisost*, 30, 1-8. ISSN-e 1025-0247 RNPS 1831. Disponible en: <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/agrisost>.
- Sánchez, E. M., Heredia, J. P., Buitrago, S. M. y Medina, J. P. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XXII (1), 36-44.
- Senaratne, W. M. T. N. y Jayaweera, J. A. A. S. (2024). Comparison of microbial preservation methods: a narrative review. *GERMS*, 14 (4): 375-386. <https://doi.org/10.18683/germs.2024.1447>.
- STATGRAPHICS Plus versión 5.0 *Online Manual, 2000*. www.statgraphics.com.
- Sumbul, A., Ali Ansari, R., Rizvi, R. y Mahmood, I. (2020). Azotobacter: a potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27, 3634-3640. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>.
- Vera Loor, M., Bernal, A., Vera, D., Leiva, M., Rivero, A. y Agustín, A. (2020). Antagonismo *in vitro* de bacterias endófitas formadoras de endosporas frente a *Moniliophthora roreri* H.C Evans. *Revista de Protección Vegetal*, 35 (2), 8 pp. E-ISSN: 2224-4697.
- Zavala, J., Alcarraz, M. y Julian, J. (2020). Evaluación para la producción de *Azotobacter* sp. promotor de crecimiento para cultivos de *Coffea arabica*. *Ciencia e Investigación*, 23 (1), 45-50. <http://dx.doi.org/10.15381/ci.v23i1.18751>.