

Azotobacter y Rhizobium como biofertilizantes naturales en semillas y plantas de frijol caupí

Azotobacter and Rhizobium as natural biofertilizers in cowpea bean seeds and plants

Mario Alcarraz Curi

Máster en Microbiología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Laboratorio de Bioprocesos Industriales. Docente-Investigador. Lima, Perú, biomac_20@hotmail.com; ID: <http://orcid.org/0000-0001-5262-2969>

Erika Gonzales Medina

Máster en Ciencias Ambientales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Laboratorio de Bioprocesos Industriales. Docente. Lima, Perú, Erika_gm01@yahoo.es; ID: <http://orcid.org/0000-0001-9172-0158>

Vidalina Heredia Jiménez

Máster en Ciencias de los Alimentos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Laboratorio de Ciencias Biológicas. Lima, Perú, vheredia@unmsm.edu.pe; ID: <http://orcid.org/0000-0002-6556-5948>

Para citar este artículo / to reference this article / para citar este artigo

Alcarraz, M., Gonzales, E. y Heredia, V. (2020). *Azotobacter y Rhizobium* como biofertilizantes naturales en semillas y plantas de frijol caupí. *Avances*, 22(2), 239-251. Recuperado de <http://www.ciget.pinar.cu/ojs/index.php/publicaciones/article/view/538/1610>

Recibido: 16 de diciembre de 2019

Aceptado: 5 de marzo de 2020

RESUMEN

El frijol caupí *Vigna unguiculata* L. Walp. (Fabaceae) es una leguminosa de ciclo corto que se utiliza principalmente como abono orgánico y en rotación de cultivos, su forraje

es de elevado valor nutritivo, constituyendo una opción importante en sistemas de integración agrícolas – ganaderos. Con el fin de medir el efecto biofertilizador de bacterias

Rhizobium y *Azotobacter* en el cultivo *Vigna unguiculata*, se realizaron ensayos para aislar las cepas *Azotobacter* a partir del suelo del Distrito La Molina, Provincia Lima, Perú en medio Winogradsky y las cepas de *Rhizobium*, a partir de nódulos de frijol, en el medio Agar-Levadura-Manitol. Estas cepas fueron inoculadas en semillas de frijol caupí o castilla (*Vigna unguiculata*), el tratamiento con mejor efecto en la germinación del frijol castilla, fue *Azotobacter* con un 80 % de germinación en comparación con el tratamiento con el agua 66% y la cepa Rizo E10, en forma individual tuvo una mayor biomasa seca a los 18 días de evaluación. Así también, en invernadero, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el peso seco de la raíz entre el tratamiento Rizo aisl+Azoto y el tratamiento con agua; en la biomasa fresca entre el tratamiento con Rizo aisl y el N+ (KNO₃ 0.1 %), con la aplicación del test de rangos múltiples de Duncan. Estas características demuestran el efecto promotor en la germinación y en el crecimiento de las plantas, de aplicación para diversos cultivos de interés en reemplazo de la fertilización química.

Palabras clave: *Azotobacter*, fijación biológica de nitrógeno, microbiología, *Rhizobium*, *Vigna unguiculata*

ABSTRACT

The cowpea bean *Vigna unguiculata* L. Walp. (Fabaceae) is a short-cycle legume that is mainly used as an organic fertilizer and in crop

rotation. Its forage has a high nutritional value and is an important option in integrated agriculture-livestock systems. In order to measure the biofertilizing effect of *Rhizobium* and *Azotobacter* bacteria in the *Vigna unguiculata* culture, tests were performed to isolate *Azotobacter* strains from the soil of La Molina District, Lima Province, Peru in Winogradsky medium and *Rhizobium* strains from bean nodules in Agar-Yeast Mannitol medium. These strains were inoculated in seeds of cowpea or castilla beans (*Vigna unguiculata*), the treatment with the best effect on the germination of castilla beans was *Azotobacter* with 80% germination compared to the treatment with water 66 % and Strain Rizo E10, individually had a greater dry biomass at 18 days of evaluation. Likewise, in the greenhouse, significant differences were observed in the dry weight of the root between the Rizo Isolate + Azoto treatment and the treatment with water; in the fresh biomass between the treatment with Rizo Isolate and N + (KNO₃ 0.1 %) with the application of Duncan's multiple range test. These characteristics demonstrate the promoter effect in the germination and growth of the plants, of application for diverse crops of interest in replacement of the chemical fertilization.

Key words: *Azotobacter*, biological nitrogen fixation, microbiology, *Rhizobium*, *Vigna unguiculata*

INTRODUCCIÓN

El frijol caupí *Vigna unguiculata* L. Walp. (Fabaceae) es una leguminosa de ciclo corto que se utiliza principalmente como abono orgánico y en rotación de cultivos, su forraje es de elevado valor nutritivo, constituyendo una opción importante en sistemas de integración agrícolas – ganaderos (Calegari, 1995). Las bacterias del género *Rhizobium* y *Azotobacter* tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N₂) y lo convierten en sustancias nitrogenadas como el amonio, en beneficio de las plantas a través del proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Aguado, 2012).

Estas bacterias además son capaces de promover el crecimiento vegetal conocidas como PGPR (*Plant Growth promoting Rhizobacteria*) (Kellman, 2008; Babu, Prasanna, Bidyarani, & Nain, 2015) y tienen un potencial de aplicación como biofertilizante en reemplazo de la fertilización química (Kloepper, Zablotowics, Tippin, & Lifshitz, 1991; Verma, Yadav, Tiwari, Lavakush & Singh, 2010; Jnawali, Bubu, & Marahatta, 2015). Para lograr un mayor rendimiento de diversos cultivos, se utilizan fertilizantes nitrogenados tradicionales, sin embargo, éstos contribuyen a la contaminación de los suelos (Hungría, Gómez, & Filho, 2016).

El uso excesivo de nitrógeno genera: problemas económicos, desequilibrios en el suelo que perjudican su fertilidad, provocan contaminación en el ambiente, principalmente en aguas utilizadas para consumo humano,

animal y vegetal. Según la Agencia de Protección ambiental de los EE.UU. (EPA, 2016), genera problemas de eutrofización, crecimiento excesivo de algas y muerte de peces. Así mismo, según Mateo-Sagasta, Marjani & Turrall (2017) de la FAO los organismos acuáticos son afectados por la contaminación agrícola (Gothandapani, Sekar, & Padaria, 2017).

Ante esta problemática, la biofertilización surge como una alternativa biotecnológica de interés ecológico y ambiental, por ejemplo Obando (2012) y Aguado (2012) realizaron estudios sobre los efectos positivos de *Rhizobium* - *Azotobacter* y otras rizobacterias estimuladoras del crecimiento demostrando que aumentan significativamente el número y peso de nódulos, mayor fijación de nitrógeno, aumento del contenido de macronutrientes y micronutrientes, en comparación con la inoculación individual de *Rhizobium* sp. (CIAT, 1987; Zúñiga, 2012 y Gonzales, 2013).

Las bacterias endofíticas han sido usadas para la fitoremediación de suelos contaminados con metales pesados (Ma *et al.*, 2016; Etesami, 2018), factor que le da importancia a el uso de este tipo de bacterias para ser usados como biofertilizantes. Por estos motivos se planteó medir el efecto biofertilizador de bacterias *Rhizobium* y *Azotobacter* en el cultivo *Vigna unguiculata*; los ensayos se realizaron en el laboratorio y en un invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los experimentos de caracterización bacteriana: se utilizaron medios de cultivo para la propagación y conservación de básico para la propagación de las cepas *Rhizobium* fue el medio LMA (Manitol 10g, extracto de levadura 0,5g, K_2HPO_4 0,5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,10g, NaCl 0,20g, agar 15g, colorante Rojo Congo 10mL/L, agua 1L, pH7) la bacteria posee las siguientes características crece a 48h a una temperatura de 28°C. Además, el medio de cultivo Winogradsky (medio para la propagación de las cepas de *Azotobacter*, KH_2PO_4 0,25g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,125g, NaCl, 0,125g, $Na_2Mo \cdot 5H_2O$, 0,005g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0,005g, $CaCO_3$ 0,1g, glucosa 10g, agar 15g, 1L pH7), crecimiento de 3 a 5 días a 28°C. Además, se utilizó una cepa control RIZO E10, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Hungria *et al.*, 2016).

Se requirió, además, materiales de laboratorio estériles, para ello se utilizó una autoclave, una estufa y agitador, frascos con magneto en su interior, termómetro de ambiente, semillas de frijol castilla suelo agrícola.

Muestreo del suelo y obtención de nódulos:

Se obtuvo una muestra de 100 g de suelo del campo agrícola experimental conocido como "Pancal" de la Universidad Nacional Agraria La Molina, de clase textural franco arcillo arenoso (55% arena, 23% limo y 22% arcilla) con una conductividad eléctrica de 1,14 dS/m y un pH de 7,34, de la Provincia Lima, Perú (12°05'06"S, 76°57'06"W, UTM ZONA-WGS84), a una altitud de 251 m.s.n.m.

En el caso los nódulos fueron obtenidos de plantas de *Phaseolus vulgaris*, de campos de la Facultad de Agronomía de la misma universidad en un suelo de clase textural Franco arenoso de pH 7,61 y una conductividad eléctrica de 3,02. El resultado de análisis fisicoquímico del suelo se resume en la *Tabla 1*. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para los futuros ensayos.

Aislamiento e identificación bacteriana de cepas de Azotobacter:

Las cepas de *Azotobacter* fueron aisladas según el Manual de Bacteriología de La Universidad Nacional Mayor de San Marcos, publicado por León, Quillama y Huamán (2017). Se utilizó una muestra de 100g de suelo, el cual se le realizaron diluciones sucesivas hasta la dilución 10^{-3} , por el método de las diluciones seriadas. Luego se dispuso 1mL de cada dilución en el medio Winogradsky por la técnica de incorporación en placa. Las colonias eran transparentes en este medio y con diámetros de 1-2 mm. Estas cepas fueron purificadas y conservadas en agar inclinado Winogradsky a 4°C para posteriores estudios.

Aislamiento e identificación bacteriana de cepas de Rhizobium:

En relación con las cepas de *Rhizobium*, éstas se aislaron de acuerdo a la metodología propuesta por el manual del CIAT (1987). Los nódulos tenían un tamaño de 4 mm. Se colocaron en sobres de papel de filtro para

hidratarse en agua destilada estéril durante 30 min, se desinfectaron en alcohol al 70 % por 1 minuto en un frasco estéril, luego se transfirió los sobres a un frasco con hipoclorito de sodio al 3 % por espacio de 3min. Se enjuagaron con agua destilada estéril hasta cinco veces. A cada nódulo se agregó una gota de agua destilada estéril por nódulo. Luego con una bageta, se aplastaron los nódulos y el macerado se sembró en placas Petri con LMA (Agar-levadura-Manitol) con Rojo Congo por estrías. Las placas fueron llevadas a la incubadora a 28°C de 2 a 4 días. A las colonias características se les aplicó coloración Gram para corroborar la identificación de género.

Ensayo en bandejas:

Se colocaron las semillas en frascos estériles, se le agregó el desinfectante hipoclorito de sodio al 2 %, por 3 min. Luego se realizaron hasta 3 lavados hasta retirar todas las impurezas. Luego se realizó la imbibición de las semillas con los inoculantes por 35 min. Al finalizar se procedió al secado por espacio de

40 min., luego se procedió a colocar las semillas en las bandejas. Se colocaron en bandejas de 31 cm de largo x 21 cm de ancho, de manera que se colocaron 10 semillas por filas x 5 semillas por columna, hasta obtener 50 semillas en total. Se evaluó el porcentaje de germinación a las 48h y biomasa seca a los 18 días de crecimiento en las bandejas.

Ensayo en macetas:

En el ensayo en macetas se requirió de la construcción de un invernadero de 1,4 m x 2,5 m. Allí se colocaron 42 macetas de plástico de 15,8 cm altura x 15,2cm de diámetro. En este ambiente la temperatura fue de 20 a 24°C. Además, se evaluó las características del suelo agrícola empleado como sustrato (*Tabla 1*). Se realizaron evaluaciones periódicas de longitud de la parte aérea en cm, cada cinco días, registrándose esos valores. Al caso de un mes de evaluación se realizó la evaluación final, en esta evaluación se registró también el peso fresco y seco de la parte aérea y radicular, el grosor del talo y la biomasa fresca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el procedimiento de aislamiento las colonias eran características. En el caso de *Rhizobium*, a las 48h eran colonias bacterianas tenían un diámetro de 3mm en el medio LMA, producen abundante mucosidad características similares a las observadas por Kellman (2008) y Hungría (2016). Las colonias de *Azotobacter* eran transparentes y

translúcidas, redondas, similares a las colonias observadas por León *et al.* (2017), (*Figura 1*). Además, en la tinción, eran Gram negativas, coloración roja característica, eran bacilares ambas cepas bacterianas. El suelo donde provenían las cepas era franco arenoso, con un pH de 6,1 y una conductividad de 3,02 (*Tabla 1*).

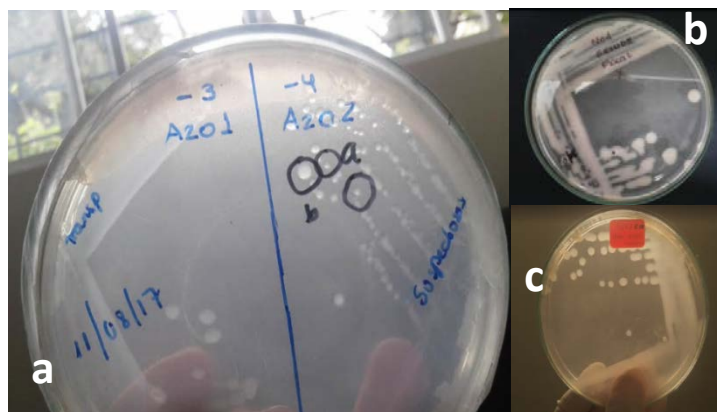


Figura 1. Representación de las colonias de *Azotobacter*, *Rhizobium* y del Control

Leyenda: (a) Cepas de *Azotobacter*, colonias en el medio Winogradsky

(b) *Rhizobium* aislados de suelos de La Molina en el medio de cultivo LMA

(c) cepa control Rizo E10.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 1. Características del suelo muestreado para la obtención de las cepas de *Azotobacter* y *Rhizobium* y del suelo empleado en el experimento con macetas.

Parámetros	Suelo muestreo	Suelo de macetas	Método
pH	7,61	7,44	Potenciómetro
Conductividad eléctrica ds/m	3,02	0,34	Conductímetro
CaCO ₃ (%)	5,70	0,10	Método gaseo-volumétrico
MO (%)	2,01	0,51	Método Walkey y Black
P(ppm)	69,8	18,2	Método de Olsen
K(ppm)	658	145	Extracción con acetato
Clase textural	Franco	Franco	Fr: Suelo franco
CIC	14,40	20,00	Saturación con acetato de amonio
Ca+2	8,45	16,63	Fotometría de llama
Mg+2	3,55	2,58	Fotometría de llama
K+	1,50	0,32	Fotometría de llama
Na+	0,90	0,46	Fotometría de llama
Al+3	0,00	0,00	Método de Yuan
N%	0,17	0,05	Método Micro-Kjeldahl

Fuente: Análisis de suelo UNALM

Los resultados de los diversos tratamientos aplicados a las semillas y plantas se aprecian

en la *Tabla 2*. La germinación de las semillas se evaluó a las 48h y 72h de colocarlas en las

bandejas. La temperatura del ambiente varió entre 20 a 21 °C durante la noche y 18-19 °C durante el día. La temperatura oscilaba entre 20-21°C y se realizaron riegos con agua destilada cada 3 días, en condiciones de esterilidad. Al finalizar el experimento se evaluó la materia fresca y seca de cada tratamiento evaluado. El resultado más resaltante fue el de la cepa *Azotobacter*, la cual obtuvo un 80 % de germinación a los 2 días de sembrarlo, mayor al agua 66 %, todo se contrastó con los resultados estadísticos y gráficas comparativas; muchas de las bacterias fijadores de N₂ presentan, además, diversos mecanismos que favorecen el desarrollo de plantas, lo que hace que sean consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal entre las más destacadas se encuentran las pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*, las cuales son bacterias de vida libre que constitutivamente poseen la cualidad de fijar N₂ atmosférico

(Arjun *et al.*, 2015; Camelo-Rusique *et al.*, 2017; Mahato y Kafle, 2018).

El tratamiento que también tuvo un buen porcentaje fue el de la interacción Rizo E10 78 % de germinación mayor al agua 66 % y la cepa E10 tuvo mayor biomasa seca en comparación al control con agua y nitrato de potasio (*Tabla 2 y Figura 2*). El mejor porcentaje de germinación y de materia seca, se debe a la liberación de sustancias benéficas, tales como fitohormonas ácido Indolacético, giberelinas rivo flavinas, nicotina (Jnawali *et al.*, 2015). En la investigación realizada por Constantino *et al.* (2010), al evaluar el efecto de los biofertilizantes en semilla de papaya, obtuvo que los tratamientos simples con *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, incrementaron el porcentaje de germinación a 90,28 % y 88,89 %, respectivamente, similar al resultado obtenido en el experimento realizado.

Tabla 2. Resultados de la evaluación de las semillas de frijol caupí, germinación a los 18 días de evaluación en bandejas de plástico.

Tratamiento	Número de semillas germinadas	Porcentaje de germinación 48h	Biomasa fresca (g) 18 días	Biomasa seca(g) 18 días
Rizo aisl.	38	76%	42	5,54
Rizo E10	39	78%	46	6,48
<i>Azotobacter</i>	40	80%	36	6,105
Rizo aisl+	34	68%	31	4,96
Azoto				
AGUA	33	66%	37	6,26
N+	43	86%	45	6,90

Fuente: Elaboración propia.

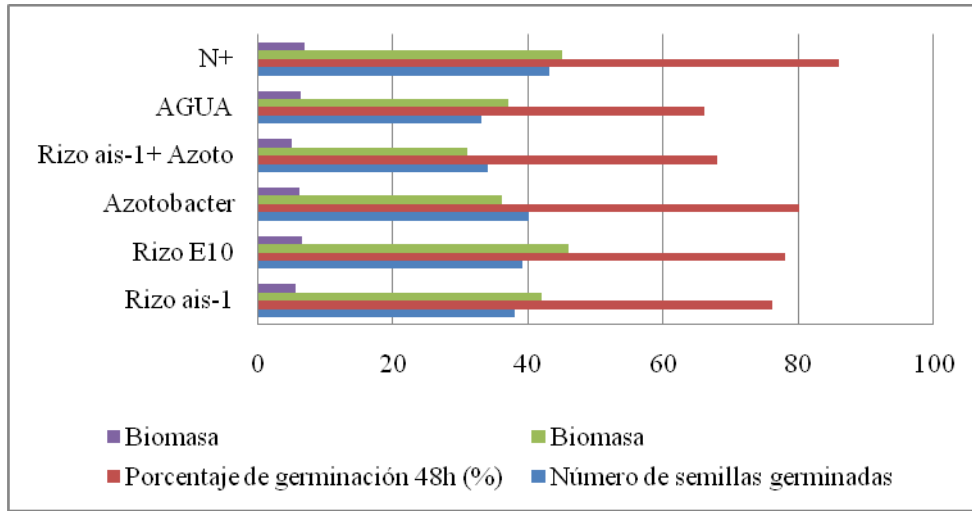


Figura 2. Comparación de la biomasa fresca y seca, número de semillas germinadas y el porcentaje de germinación (%) del experimento en bandejas con frijol caupí.

Fuente: Elaboración propia.

En los ensayos en invernadero, luego de realizar la inoculación de las semillas, se aplicó 1 mL del biofertilizante, se obtuvo que las plantas inoculadas con las cepas de *Azotobacter* y *Rhizobium*, como inoculantes individuales tuvieron un mejor efecto en el crecimiento que las cepas en consorcio. El

suelo empleado fue franco arenoso, con pH 7,44 y 0,34 óptimos para el crecimiento del cultivo de frijol caupí. En la *Tabla 3* y *Figura 3*, se aprecian el efecto periódico de la LPA en las plantas de frijol caupí y el efecto durante la evaluación.

Tabla 3. Longitud de la parte aérea (LPA) de las plántulas de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) en el ensayo en macetas.

Tratamientos	Evaluación periódica de la longitud de la parte aérea (cm)					
	5 días	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
Rizo aisl.	2,6	11,13	10,84	12,21	14,26	14,93
Rizo E10	1,43	7,47	10,05	11,56	12,31	13,51
<i>Azotobacter</i>	1,88	8,44	11,33	12,35	14,10	15,36
Rizo E10+Azot	1,56	8,49	9,86	10,83	11,84	12,49
Rizo aisl+ Azoto	1,51	6,85	9,62	11,22	12,52	13,17
Agua	1,77	8,10	9,93	11,45	12,33	13,02
N+	1,79	7,63	9,33	11,41	13,60	14,35

Fuente: Elaboración propia.



Figura 3. Gráfico comparativo de las plantas de frijol caupíen invernadero a los 15 días de evaluación, de izquierda a derecha *Azotobacter*, N+ y agua.

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados en las plantas fueron evaluados diariamente, observándose que la cepa Rizo E10 tuvo un mejor crecimiento con respecto al N+ y al agua. Todos los resultados promedio de las evaluaciones de los parámetros de evaluación final se aprecian en la *Tabla 4*.

En base a los resultados podemos afirmar que las bacterias de vida libre, tal es el caso de *Azotobacter* mejoran el crecimiento vegetal, conocidas como bacterias promotoras de crecimiento (PGPR), las cuales pueden mejorar la germinación de las semillas a través de la producción y liberación de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal como la auxina (Sridevi y Mallaiah, 2007), las citoquininas o giberelinas en medios químicamente definidos y en asociación con plantas (Verma *et al.*, 2010; Babu *et al.*, 2015).

En relación con los biofertilizantes mixtos, según Babu *et al.* (2015) las cepas promotoras

de crecimiento vegetal (PGPR), mejoran la biomasa de las plantas, la toma de nutrientes y el rendimiento, especialmente cuando son aplicados en combinación. En el caso de plantas no leguminosas, es necesario modular los procesos de colonización y supervivencia, como ocurre a menudo con las cepas *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en la rizósfera, en los cuales es necesaria la incorporación de cepas adicionales, como Agentes Promotores de Crecimiento Vegetal (PGP) (Babu *et al.*, 2015); tales como *Azotobacter*, debido a que, éstas incrementan el crecimiento de brotes y raíces, el desarrollo de la raíz, regulación hormonal de la planta, fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales y la supresión de patógenos, la colonización de la raíz, los cuales son pasos importantes en la asociación microbiana con las plantas.

Tabla 4. Evaluación a los 30 días de evaluación del cultivo frijol caupí en macetas.

Tratamientos	LPA (cm)	LR (cm)	PFFA (g)	PFR (g)	PSPA (g)	PSR (g)	GR.TALLO (cm)	BIO.FRESCA (g)
Rizo aisl	15,4028	7,1722	1,8200	,3072	,18178	,02725	2,3000	6,2102
Rizo E10	14,3667	6,2667	1,7453	,3147	,19533	,02920	2,5000	6,4120
Azoto	15,9222	6,2139	1,9072	,3000	,16994	,02619	2,2778	5,6267
Rizo aisl+Azoto	13,4056	6,0611	1,6400	,3211	,16533	,03494	2,3889	6,1500
Rizo E10+Azoto	13,4056	7,2722	1,6611	,3483	,16061	,02956	2,3694	4,9800
Agua	14,1500	7,0194	1,5567	,2922	,16325	,02219	2,0574	5,0267
N+	14,9361	6,5528	1,4783	,2665	,18604	,02668	2,2847	3,7081

Leyenda: *LPA: Longitud de parte aérea, LR: Longitud de raíz, PFFA: Peso fresco de parte aérea, PFR: peso fresco de raíz, PSPA: peso seco de parte aérea, PSR: peso seco de raíz, GR. Tallo: Grosor de tallo y BIO FRESCA: biomasa fresca.

Fuente: Elaboración propia.

Gothandapani *et al.* (2017) menciona que las bacterias *Azotobacter* tienen propiedades benéficas en la promoción de crecimiento debido a la producción de Ácido Indolacético (AIA) o giberelinas. Finalmente, Verma *et al.* (2010) también consideran a *Rhizobium* como un promotor de crecimiento vegetal, tal como ha sido demostrado en diversos estudios en la India. Según Lobo, *et al.* (2018) el uso de PGPR como inoculante proporciona un enfoque ambientalmente sostenible para aumentar la producción de cultivos. La eficacia de los inoculantes depende de su producción, formulación y almacenamiento adecuados

para garantizar la aplicación del número necesario de células microbianas viables. Los resultados obtenidos son una base para futuros ensayos de aplicación en campo, para mejorar la productividad del cultivo. Así como, para la recuperación de suelos agrícolas impactados por contaminantes por lo que existe un futuro prometedor para la aplicación de los biofertilizantes a gran escala para este cultivo y diversos cultivos de importancia ambiental y agroindustrial. Así como contribuir al desarrollo de una agricultura sostenible generando un impacto positivo para el agricultor y el ambiente.

CONCLUSIONES

Con base a las evaluaciones microscópicas, características morfológicas Winogradsky y procedimientos de tinción podemos afirmar

que las cepas estudiadas corresponden a bacterias *Azotobacter* sp., con cualidades de una bacteria *Azotobacter chroococum* una

especie muy característica de los suelos agrícolas. Además, la cepa Rizo aisl1, de acuerdo con las características evaluadas en LMA (Levadura-Manitol Agar) son muy similares a la cepa Rizo E10 (control) y se trataría de una cepa de *Rhizobium* sp.

En el experimento en bandejas con semillas del frijol caupí, el tratamiento con *Azotobacter* tuvo un buen porcentaje de germinación 80 % superior al agua 66 % a las 48h de evaluación. Además, el mismo tratamiento tuvo un buen crecimiento de la parte aérea y de la raíz, luego de 18 días de evaluación en las bandejas.

A los 18 días de evaluación en las bandejas, con frijol caupí, la mayor biomasa fresca fue de Rizo E10, con 46g de fresca en

comparación con el agua, 37g y el N+, 45g. Además, al evaluar la materia seca esta misma cepa obtuvo una materia seca de 6.48g, la cual fue mayor al control con agua 6,26g.

En el experimento en invernadero, con plántulas inoculadas del frijol caupí, el tratamiento cepa Rizo E10 tuvo un buen crecimiento en la parte aérea y radicular, reflejado por un mayor número de hojas y peso seco en comparación con el control N+ (KNO₃) y agua.

Agradecimientos

Al equipo de investigación del Laboratorio de Bioprocesos industriales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguado, G. (2012). *Introducción al uso y manejo de los fertilizantes en la agricultura*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaria de agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. INIFAP/SAGARPA.

Arjun, D.J., Roshan, B.O., Sushma, M. (2015) Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—A Review. *Advances in Plants y Agriculture Research* 2(6): 250-253; doi: 10.15406/apar.2015.02.00069

Babu, S., Prasanna, R., Bidyarani, N., & Nain, L. (2015). Synergistic action of PGP agents and *Rhizobium* spp. for improved plant growth, nutrient

mobilization and yields in different leguminous crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 456-464. DOI: doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.004.

Calegari, A. (1995). *Leguminosa para Adubação verde de verão no Paraná*. Circular No. 80. Londrina, Brasil: Instituto Agronômico Do Paraná. IAPAR.

Camelo-Rusínque, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F. & Bonilla-Buitrago, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología* 49(3), 289-296. DOI:

- <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. (1987). *Simbiosis Leguminosa – Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico*. Cali, Colombia.
- Constantino, M., Gómez-Álvarez, J., Álvarez-Solís, D., Pat-Fernández, J. y Espín, E. G. (2010). Efecto de la biofertilización y los biorreguladores en la germinación y el crecimiento de *Carica papaya* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 103-115. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/18548/19945>
- Environmental Protection Agency, EPA. (2016). Chapter 12. Environment and Agriculture. En Environmental Protection Agency, EPA (2016). *Ireland's Environment An Assessment*. Wexford, Irlanda: Ireland's Environment an Assessment.
- Etesami, H. (2018). Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 175–191. DOI: doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032
- Gonzales, E. (2013). *Estudio de la diversidad de cepas de Rhizobium provenientes de nódulos de tres variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* (Tesis para optar el Título de Biólogo). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Gothandapani, S., Sekar, S., & Padaria. J. (2017). *Azotobacter chroococcum*: Utilization and potential use for agricultural crop production: An overview. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(3), 35-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.03.004>
- Hungría, M., Gomez, D. & Filho, A. (Eds.) (2016). *XXVII Reunión Latinoamericana de Rizobiología: fortaleciendo as parcerias Sul-Sul*. Curitiba, Brasil: Núcleo Estadual Paraná (NEPAR).
- Jnawali, A., Babu, R., & Marahatta, S. (2015). Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustentainabiliy-a review. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2(6), 250-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>
- Kellman, A. W. (2008). *Rhizobium* inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy). Lincoln University. Canterbury, New Zealand.
- Kloepper, J. W., Zablotowicz, R. M., Tipping, E. M., & Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En D. L. Keister & P. B. Cregan (Ed.), *The*

- rhizosphere and plant growth*. Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publishers. pp. 315-326.
- León, J., Quillama, E. y Huamán, M. (2017). *Manual de prácticas de Bacteriología* (Inédito). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima.
- Lobo, C. B., Juárez, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2018). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12-25. DOI: doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C. y Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 174, 14-25. DOI: doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047
- Mahato, S. & Kafle, A. (2018). Comparative study of *Azotobacter* with or without other fertilizers on growth and yield of wheat in Western hills of Nepal. *Annals of Agrarian Science*, 16(3), 250-256. DOI: https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.04.004
- Mateo-Sagasta, J., Marjani, S., & Turrall, H. (2017). *Water pollution from agriculture: a global review*. Rome: The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Obando, D. (2012). *Respuesta fisiológica del frijol caupí (Vigna unguiculata (L.) Walp) a la co-inoculación de bacterias diazotróficas de los géneros Azotobacter y Rhizobium en suelos del departamento del cesar* (Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias Agrarias). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Sridevi, M., & Mallaiah, K. V. (2007). Production of Indole-3-Acetic Acid by *Rhizobium* Isolates from *Sesbania* species. *African Journal of Microbiology Research*, 1(7), 125-128.
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., Lavakush, & Singh, V. (2010). Impact of plant growth promoting Rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*, 5(11), 954-983. DOI: doi.org/10.3923/ijar.2010.954.983
- Zúñiga, D. (2012). *Manual de Microbiología Agrícola: Rhizobium, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad*. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.