

Artículo Original

Efecto del biofertilizante *azotobacter-rhizobium* en tarwi (*Lupinus mutabilis* SWEET.), como alternativa a la fertilización químicaEffect of biofertilizer *azotobacter-rhizobium* on tarwi (*Lupinus mutabilis* SWEET.), as an alternative to chemical fertilizationErika Gonzales¹, Mario Alcarraz^{1,2}, Américo Castro³, Sheilla Casas¹¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú.² Autor corresponsal. E-mail: biomac_20@hotmail.com³ Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.**Resumen**

La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del biofertilizante *azotobacter-rhizobium* en *Lupinus mutabilis* Sweet "tarwi", como alternativa a la fertilización química. Se aislaron cepas de *Rhizobium sp* y *Azotobacter sp* a nivel de laboratorio e invernadero a partir de nódulos de frijol y tierras agrícolas de la UNALM (Universidad Nacional Agraria La Molina). Luego de una selección se formularon y aplicaron como biofertilizantes bacterianos en semillas y plántulas de tarwi. Los resultados a nivel de laboratorio mostraron el mejor tratamiento con *Azotobacter sp*. con 70% de germinación, superior al tratamiento solo con agua (control negativo) en el cual se obtuvo 42% de germinación. Además, la biomasa seca después del tratamiento con la cepa Rizo1 (*Rhizobium sp*. aislado) fue superior al nitrato de potasio (N+) luego de 20 días de evaluación. En nivel invernadero, hubo diferencias estadísticamente significativas en el parámetro longitud de raíz (LR) entre el tratamiento *Azotobacter sp* y el agua; así como entre, *Azotobacter sp* y N+, en el peso seco de raíz (PSR). Los resultados permiten concluir que los biofertilizantes investigados muestran un buen efecto promotor de germinación y desarrollo de las plantas de tarwi, por consiguiente, se consideraría un gran potencial de aplicación para diversos cultivos de interés en reemplazo de la fertilización química.

Palabras clave: *Rhizobium*; *Azotobacter*; *Lupinus mutabilis* Sweet.; Fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Abstract

The objective of the research was to evaluate the effect of the *azotobacter-rhizobium* biofertilizer in *Lupinus mutabilis* Sweet "tarwi", as an alternative to chemical fertilization. *Rhizobium sp* and *Azotobacter sp*. strains were isolated from bean nodules and agricultural lands of the UNALM (Universidad Nacional Agraria La Molina). After a selection, they were formulated and applied as bacterial biofertilizers in seeds and seedlings of tarwi. Results at laboratory level showed the best treatment with *Azotobacter sp*. with 70% germination, superior to the water treatment (negative control) with 42% of germination. In addition, the dry biomass after treatment with Rizo 1 strain (*Rhizobium sp*.) was superior to potassium nitrate (N +) after 20 days of evaluation. At the greenhouse level, there were statistically significant differences in the root length (LR) parameter between the *Azotobacter sp* treatment and the water. As well as, *Azotobacter sp* and N +, in the root dry weight (RDW). The results allow concluding that the investigated biofertilizers show a good promoter effect on germination and development of tarwi plants, therefore it would be consider a great potential for application to diverse crops of interest in replacement of chemical fertilization.

Keywords: *Rhizobium*; *Azotobacter*; *Lupinus mutabilis* Sweet.; Biological nitrogen fixation (BNF).

Correspondencia:

Nombre: Mario Alcarraz Curi

Correo: malcarrazc@unmsm.edu.pe / biomac_20@hotmail.com

Recibido: 08/08/2018

Aceptado: 05/02/2019

Citar como:

Gonzales, E., Alcarraz, M., Castro, A., Casaa, S. Efecto del biofertilizante *azotobacter-rhizobium* en tarwi (*Lupinus mutabilis* SWEET.), como alternativa a la fertilización química. Ciencia e Investigación 2018 21(2):7-12.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercia. Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

INTRODUCCIÓN

El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), originario de las zonas altoandinas del Perú es considerado un cultivo de gran valor alimenticio, debido a su importante contenido de proteínas (41-51%) que supera al de la soya, el cual posee 33,4% de proteína¹. Además, establece una efectiva asociación con bacterias del género *Rhizobium* y *Azotobacter*, quienes tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N₂) de forma simbiótica o libre respectivamente a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN)². A este grupo de bacterias se les considera también como *Plant Growth promoting Rhizobacteria* (PGPR)^{3,4} por su potencial de aplicación como biofertilizantes en reemplazo de la fertilización química^{5,6}. El cultivo de tarwi puede fijar entre 60 a 120 Kg de N por campaña, con la colaboración de las bacterias de la rizósfera, lo cual beneficia la fertilidad de los suelos y como consecuencia reducir el uso de fertilizantes químicos¹⁵. Según la Agencia de Protección Ambiental, la aplicación excesiva de fertilizantes químicos aplicados a los cultivos puede afectar el suelo, genera problemas de eutrofización, crecimiento excesivo de algas y muerte de peces⁷. Ante esta problemática, la biofertilización surge como una alternativa biotecnológica de interés ecológico y ambiental. Además, entre los efectos positivos de *Azotobacter*, se sabe que son productoras potenciales de metabolitos benéficos para las plantas como giberelinas, ácido indolacético (AIA), tienen capacidad de ser antagonistas es decir inhibir el crecimiento de hongos, además de fijar nitrógeno atmosférico^{8,9}. Los consorcios bacterianos de *Rhizobium* - *Azotobacter* han demostrado que incrementan significativamente el peso y el número de nódulos, la fijación de nitrógeno, así como el contenido de micronutrientes y macronutrientes, superando a la inoculación individual¹⁰. Por estos motivos se planteó la presente investigación sobre los efectos de la biofertilización de bacterias *Rhizobium* y *Azotobacter* en el cultivo de tarwi, los ensayos se realizaron en laboratorio donde se utilizaron seis tratamientos y en invernadero siete tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental. El utilizó un diseño en bloques completos al azar con seis grupos de tratamientos y seis repeticiones por tratamiento, en los ensayos de germinación el laboratorio, según lo siguiente:

- **Grupo I. Rizo 1**, inoculante de *Rhizobium* sp aislado
- **Grupo II. Rizo E10**, inoculante comercial de *Rhizobium* sp
- **Grupo III. Azotobacter**, inoculante bacteriano aislado
- **Grupo IV. Rizo 1 + Azoto**, consorcio bacteriano de *Rhizobium* y *Azotobacter*
- **Grupo V. Agua**, grupo control
- **Grupo VI. N+**, solución de nitrato de amonio 0,1%

En los ensayos en invernadero, se asignaron los mismos grupos y se incluyó un grupo adicional Grupo VII, constituido por el consorcio Rizo E10 + *Azoto*.

MATERIALES

En los experimentos de caracterización bacteriana, el medio de cultivo que se usó para la propagación y conservación de las cepas *Rhizobium* fue el medio LMA (Manitol 10g; extracto de levadura 0,5g; K₂HPO₄ 40,5g; MgSO₄·7H₂O 0,10g; NaCl 0,20g; agar 15g; colorante Rojo congo 10mL y agua 1L; pH7) incubando durante 48h a 28°C. Mientras que para cepas *Azotobacter* se usó el medio Winogradsky (KH₂PO₄ 0,25g; MgSO₄·7H₂O 0,125g; NaCl 0,125; Na₂Mo·5H₂O 0,005g; MnSO₄·4H₂O 0,005g; CaCO₃ 0,1g; glucosa 10g; agar 15g y agua 1L; pH7) incubando durante 72h a 28°C. Para los biofertilizantes se usó el medio C (Manitol 6g; glucosa 6g; extracto de levadura 0,5g; K₂HPO₄ 0,5g; NaCl 0,20g; Na₂Mo·5H₂O 0,005g; MnSO₄·4H₂O 0,005g; CaCO₃ 0,1g; agar 15g y agua 1L, pH7). Se utilizó una cepa control RIZO E10, (UNALM)¹³ Adicionalmente, se trabajó con semillas de tarwi y suelo agrícola.

Muestreo del suelo y obtención de nódulos

Se obtuvo una muestra de 100 g de suelo agrícola de la UNALM. En el caso los nódulos fueron obtenidos de plantas de *Phaseolus vulgaris*, de cultivos de la Facultad de Agronomía de la misma universidad. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para los futuros ensayos (Tabla 1).

Aislamiento e identificación bacteriana de cepas de *Azotobacter*

Se utilizó una muestra de 100g de suelo, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³. 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 Winogradsky inclinado para posteriores aplicaciones. Adicionalmente se realizó tinción Gram.

Aislamiento e identificación bacteriana de cepas de *Rhizobium*

Se aislaron de acuerdo a la metodología propuesta por el manual del CIAT¹⁴. Los nódulos tenían un tamaño de 4 mm y se colocaron en sobres de papel de filtro para hidratarse en agua estéril destilada durante 30 minutos, se desinfectaron en alcohol 70% por 1 minuto en un frasco estéril, luego se transfirió los sobres a un frasco con hipoclorito de sodio 3% por espacio de 3 minutos. Se lavaron con agua estéril destilada hasta cinco veces. A cada nódulo se agregó una gota de agua destilada estéril por nódulo. Luego con la ayuda de una bagueta se aplastaron los nódulos y el macerado se diseminó en placas de Petri con LMA por agotamiento. Las placas fueron llevadas a la incubadora a 28 °C de 2 a 4 días. Adicionalmente se realizó tinción Gram¹¹.

Ensayo de germinación de semillas de tarwi en el laboratorio

Se desinfectaron las semillas con hipoclorito de sodio 2%, por 3 min. A continuación, se lavaron tres veces consecutivas hasta retirar todas las impurezas. Luego se realizó la inbibición de las semillas en frascos de vidrio de 250mL, con los diferentes tratamientos mencionados, por un tiempo de 35 min y luego se secaron por 40 min. Finalmente, se colocaron en bandejas de 310 mm de largo x 210 mm de ancho, de manera que se colocaron 10 semillas por fila y 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 con semillas de tarwi inoculadas en el invernadero

En el ensayo en macetas se requirió de la construcción de un invernadero de 1,4 m x 2,5 m. En este espacio se colocaron 42 macetas de plástico de 15,8 cm altura x

15,2 cm de diámetro, con 1,100 Kg de suelo agrícola en cada maceta. En este ambiente la temperatura fue de 20 a 24 °C. Adicionalmente, se obtuvo los datos de las características del suelo agrícola utilizado en el presente estudio (Tabla 1). Se realizaron evaluaciones periódicas de longitud de parte aérea en cm periódicamente. Se realizó la evaluación final, donde se registró el peso fresco y seco de la región aérea y radicular (g), el grosor del tallo (cm) y la biomasa fresca (g).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El resultado del análisis fisicoquímico del suelo se aprecia en la Tabla 1. En el aislamiento de 48h se obtuvieron colonias características de *Rhizobium* y *Azotobacter*, que presentaron tres y dos mm de diámetro, en el medio LMA y Winogradsky respectivamente. (Figura 1).

Además, en ambos casos la tinción mostró bacilos Gram negativos. Los diversos tratamientos aplicados a las

Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo muestreado para la obtención de las especies de *Rhizobium* y *Azotobacter* y del suelo de macetas.

Parámetros	Suelo del 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 gaseoso-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: Elaboración propia.

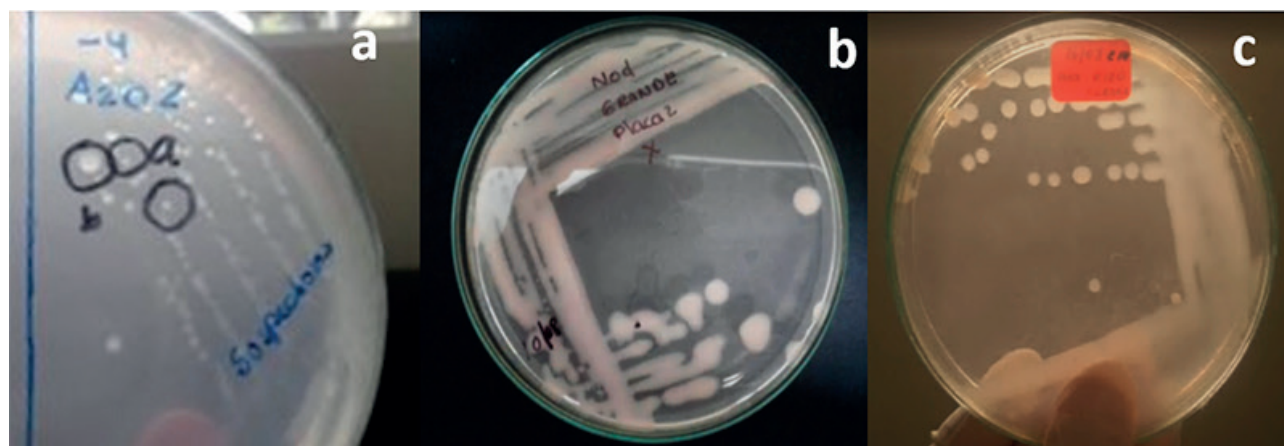


Figura 1. (a) Cepas de *Azotobacter*, (b) *Rhizobium* aislados de suelos de la UNALM código: Rizo 1. (c) Cepa control Rizo E10

semillas y plantas se resumen en la Tabla 2. La germinación de las semillas se evaluó a las 48 h y 72 h de colocarlas en las bandejas. La temperatura del ambiente tuvo variaciones entre 20 -21 °C durante la noche y 18-19 °C durante el día. Se realizaron riegos con agua destilada cada 3 días, en condiciones de esterilidad. Al finalizar el experimento se evaluó la materia fresca y seca después cada tratamiento. El resultado más importante fue el de la cepa *Azotobacter* (Figura 2a), la cual obtuvo un 70% de germinación a los 2 días de sembrado mayor al porcentaje de germinación (42%) con agua, todo se contrastó con los resultados estadísticos y gráficas comparativas (Tabla 2 y Figura 2). Rubio, en el año 2012, también tuvo un resultado similar en un experimento en bandejas con trigo al aplicar *Azotobacter*⁸.

En el experimento en macetas, las semillas inoculadas con *Azotobacter* tuvieron un mayor longitud de la parte aérea (LPA), 27,42 cm y longitud de raíz (LR) fue 15,11 cm, en comparación con el agua, cuya LPA fue de 22,73 cm y LR fue de 8,63 cm (Tablas 3 y 4). Al realizar el análisis comparativo de los rangos múltiples de los tratamientos, procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) y en análisis de rangos múltiples de Duncan, para el parámetro LR (longitud de raíz) se observó diferencias significativas entre diferentes tratamientos (Tabla 4). Así, se apreciaron diferencias signifi-

cativas de la longitud de la raíz entre el tratamiento solo con Rizo1 y con el tratamiento solo con *Azoto*; entre el tratamiento solo con Rizo E10 y solo con *Azoto*., entre tratamiento solo con *Azoto* y el consorcio Rizo 1 +*Azoto* y finalmente entre tratamiento solo con *Azoto* y el tratamiento con agua (Figura 3). Las bacterias *Rhizobium* y *Azotobacter* pueden mejorar la germinación de las semillas a través de la producción y liberación de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal como la auxina, las citoquininas o giberelinas en medios químicamente definidos y en asociación con plantas⁴. En relación a los biofertilizantes mixtos, 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 combinación¹². 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 PGPR; tales como *Azotobacter*, debido a que, éstas incrementan el crecimiento de brotes y raíces, el crecimiento de la raíz, regulación hormonal del ejemplar, fijación de nitrógeno, 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 2. Resultados de la evaluación de las semillas de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.), en la prueba de germinación a las 48 y 72 h y la evaluación a los 20 días en laboratorio.

Grupos	48 h		72 h		Biomasa Fresca (g) 20 días	Biomasa Seca (g) 20 días
	NSG*	%G†	NSG*	%G†		
Rizo1	12	24	25	50	87,16	9,0860
Rizo E10	12	24	16	32	80,50	8,5500
<i>Azotobacter</i>	26	52	35	70	72,58	8,0685
Rizo1+ <i>Azoto</i>	20	40	27	54	84,68	7,3346
Agua	18	36	21	42	74,18	7,4808
N*	17	34	24	48	83,30	4,2973

*NSG: Número de Semillas Germinadas, †%G: Porcentaje de germinación (%), se resaltaron los mayores valores con respecto a los controles agua y control N+

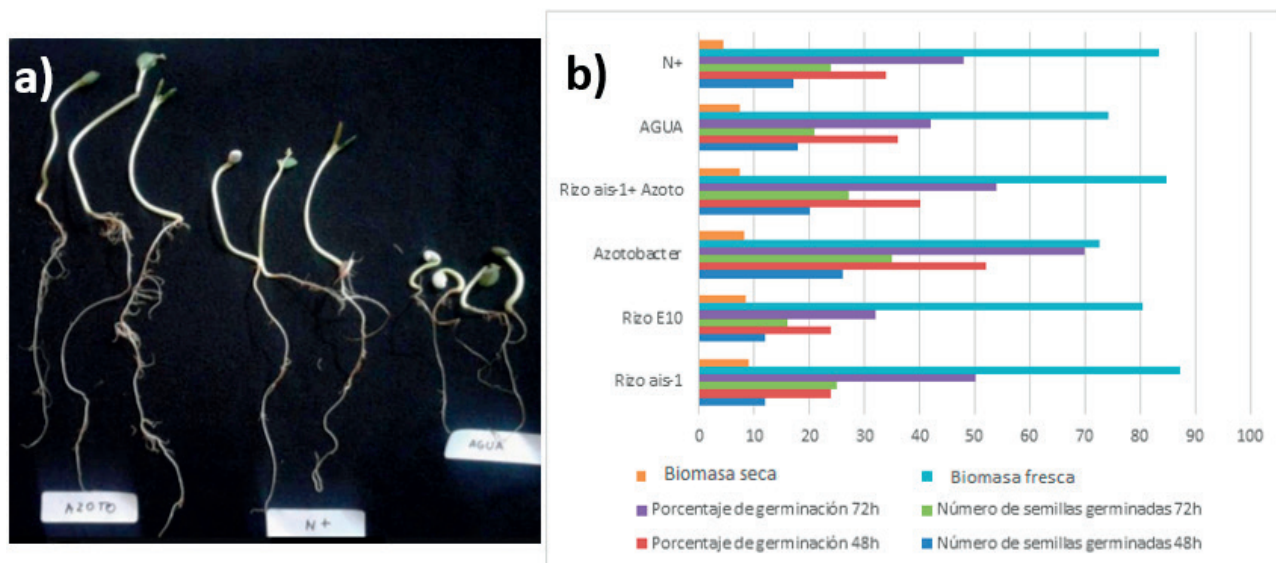


Figura 2. a) Semillas de tarwi con tratamientos de *Azotobacter*, N+ y agua (20 días de crecimiento en bandejas). b) Gráfico comparativo de la biomasa fresca y seca, número de semillas germinadas y el porcentaje de germinación (%) del experimento en bandejas.

Tabla 3. Longitud de la parte aérea de las plántulas de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) en macetas.

Grupos	Evaluación periódica de la longitud de la parte aérea (cm)					
	5 días	10 días	15 días	20 días	25 días	30 días
Rizo1	7,17	11,15	13,86	15,676	18,886	20,44
Rizo E10	9,04	13,49	18,22	20,919	23,201	24,88
Azotobacter	10,83	15,03	19,59	23,104	24,742	27,43
Rizo E10+azo*	9,83	13,09	17,77	21,543	23,276	25,83
Rizo1+ azoto	8,06	11,73	15,59	18,057	19,803	22,44
Agua	8,50	12,60	16,51	19,024	20,849	22,73
N*	8,85	14,72	16,18	18,429	21,033	22,90

*Se incluyó el grupo adicional Grupo VII (Rizo E10+Azo)

Tabla 4. Evaluación a los 30 días de evaluación del cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) en macetas

Grupos	LPA* (cm)	LR* (cm)	PFPA* (g)	PFR* (g)	PSPA* (g)	PSR* (g)	GROSOR DE TALLO (cm)	BIOMASA FRESCA (g)
Rizo1	20,44	8,59	2,13	0,36	0,18	0,03	2,05	2,41
Rizo E10	24,88	9,23	2,31	0,39	0,19	0,03	2	2,70
Azotobacter	27,44	15,11	2,3	0,54	0,20	0,06	2,10	2,84
Rizo1+Azoto	22,44	8,07	2,32	0,38	0,19	0,04	2,23	2,70
RizoE10+Azoto	25,83	11,32	2,36	0,42	0,21	0,07	2,31	2,64
Agua	22,73	8,63	2,25	0,32	0,20	0,03	2,15	2,56
N*	22,9	11,74	2,01	0,41	0,18	0,02	2,03	2,42

*LPA: Longitud de parte aérea, LR: Longitud de raíz, PFSA: Peso fresco de parte aérea, PFR: peso fresco de raíz, PSPA: peso seco de parte aérea, PSR: peso seco de raíz

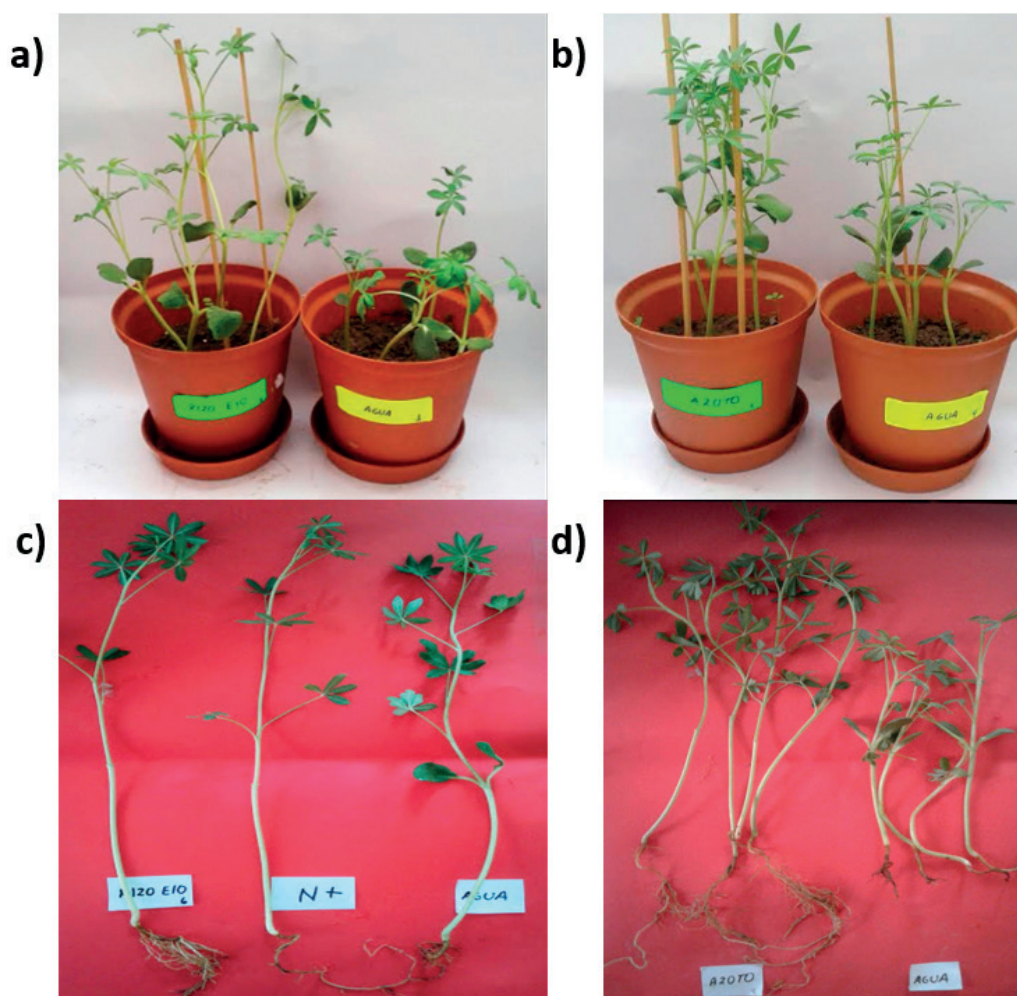


Figura 3. Gráfico comparativo de las plantas de las plántulas de tarwi a los 17 días de evaluación (a) plantas inoculadas con Rizo E10 y el control agua y en (b) plantas inoculadas con Azotobacter y el control agua. Plántulas de tarwi a los 30 días de evaluación a partir de las macetas, en (c) cepas de Rizo E10, N+ y agua, (d) Azotobacter y agua.

Se considera a *Rhizobium* como un promotor de crecimiento vegetal, tal como ha sido demostrado en diversos estudios en la India³. Los resultados obtenidos son una evidencia científica de interés para futuros ensayos de aplicación en campo, para mejorar la productividad del cultivo. Así como, para la recuperación de suelos agrícolas impactados por contaminantes y abren un futuro prometedor para la aplicación de biofertilizantes a gran escala para este y diversos cultivos de importancia ambiental y agroindustrial.

CONCLUSIONES

- Los biofertilizantes investigados en *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”, muestran efecto promotor en la germinación y en el crecimiento.
- El mayor porcentaje de germinación de las semillas de lupinos se obtuvo con el tratamiento con el grupo III (*Azotobacter*) a las 72 h, en comparación grupo V (solo con agua). El tratamiento con el grupo I (cepa Rizo1) presentó mayor peso seco en comparación con el tratamiento con el grupo V (agua).
- En el experimento en macetas, el tratamiento con el grupo III (*Azotobacter*) tuvo una mayor diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo V (solo con agua) en el parámetro longitud de raíz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jacobsen SE, Mujica A. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los andes centrales. 2006; 28:458-82.
- Kellman A. Rhizobium inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [Tesis doctoral], Lincoln University, Scotland; 2008.
- Verma JP, Yadav J, Tiwari KN, Lavakush SV. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. Int J Agric Res. 2010; 5(11):954-83.
- Klopper JW, Zablutowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R.. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In the rhizosphere and plant growth 1991 (pp. 315-326). Springer, Dordrecht.
- Hungría, M., Gomez, D. Filho. A. Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. XXVII. Libro de resúmenes. 2016. Lodrina. Brasil.
- Zúñiga D. Manual de microbiología agrícola: *Rhizobium*, PGPR, indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Ed. Olaya M. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. 2012.
- EPA (Environmental Protection Agency). Environment and Agriculture. 2016. Recuperado de: www.epa.ie/media/Chapter12_Environment_Agriculture.pdf.
- Rubio, J. E. Caracterización molecular de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación del trigo. [Tesis para optar el grado de Magister] Universidad de Buenos Aires; 2013.
- Gothandapani S, Sekar S, Padaria JC. Azotobacter chroococcum: utilization and potential use for agricultural crop production: an overview. Int. J Adv Res. Biol Sci. 2017; 4(3):35-42.
- Aguado, G. Introducción al uso y manejo de los fertilizantes en la agricultura. México. INIFAP/SAGARPA. 2012. México.; pp 1-19.
- Sylvester-Bradley R, Campuzano de Ramírez F, García Ortiz A. Aislamiento, caracterización y evaluación de rizobios para leguminosas forrajeras en suelos ácidos de América tropical: guía metodológica.
- Babu S, Prasanna R, Bidyarani N, Nain L, Shivay YS. Synergistic action of PGP agents and *Rhizobium* spp. for improved plant growth, nutrient mobilization and yields in different leguminous crops. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2015; 1(4):456-64.
- Gonzales, E. “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 Profesional]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2013.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1987. Simbiosis Leguminosa – Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Colombia. Editado por Rosemary Sylvester- Bradley.1-25
- Tapia, M. El tarwi, lupino andino. Fondo Italo-Peruano. Recuperado de: <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf>. 2015. Perú.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Autofinanciado