

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE Rhizobium leguminosarum  
biovar phaseoli EN CUATRO SOPORTES NO ESTERILES,  
CON POTENCIAL PARA PREPARAR INOCULANTES.

TESIS

Presentada a la Honorable Junta Directiva  
de la Facultad de Agronomía  
de la Universidad de San Carlos de Guatemala

POR  
VICTOR MANUEL SABAN CHIN

EN EL ACTO DE CONFERIRSELE EL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

GUATEMALA, FEBRERO DE 1990

UNIVERSIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL  
01  
T(1316)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

R E C T O R

LIC. RODERICO SEGURA TRUJILLO

JUNTA DIRECTIVA

DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO:	Ing. Agr. Anibal B. Martínez Muñoz
VOCAL PRIMERO:	Ing. Agr. Gustavo A. Méndez Gómez
VOCAL SEGUNDO:	Ing. Agr. Jorge E. Sandoval Illescas
VOCAL TERCERO:	Ing. Agr. Mario F. Melgar Morales
VOCAL CUARTO:	Br. Marco Antonio Hidalgo
VOCAL QUINTO:	Br. Byron Milián Vicente
SECRETARIO	Ing. Agr. Rolando Lara Alecio



FACULTAD DE AGRONOMIA  
GUATEMALA, C. A.

9 de septiembre de 1988.

Ing. Agr. Anibal Martínez M.  
Decano  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Ciudad Universitaria, Zona 12.

Ingeniero Martínez:

Me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que, en base a la designación de su despacho, procedí a asesorar el trabajo de tesis del estudiante Víctor Manuel Sabán Chin, carnet No. 78-04117, titulado:

"Evaluación de la sobrevivencia de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli en cuatro soportes no estériles, con potencial para preparar inoculantes".

Debo manifestar que esta investigación, además de constituir una información base dentro del proyecto de Fijación Biológica de Nitrógeno, llena la calidad técnica y científica que nuestra Alma Mater exige, por lo que sugiero su aprobación.

Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

  
Ing. Agr. Rolando Aguilera  
A S E S O R

/eqded

Guatemala,  
9 de septiembre de 1989

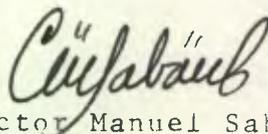
Señores  
HONORABLES MIEMBROS  
JUNTA DIRECTIVA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
Presente.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo que establece la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:  
" EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli EN CUATRO SOPORTES NO ESTERILES, CON POTENCIAL PARA PREPARAR INOCULANTES ".

Presentándolo como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo, en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Respetuosamente.



Víctor Manuel Sabán Chin

vmsch.

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Gran Arquitecto del Universo

A MIS PADRES: Magdaleno Sabán R.  
Cecilia Chin de Sabán.

A MIS HERMANOS Mario (QEPD), Ricardo, Max, Juan José  
Carlos, Armando, Raúl, Magdaleno,  
María Martha, Julio y Venancio (QEPD).

A MI FAMILIA EN GENERAL.

A UNA PERSONA ESPECIAL:  
Joyci Muriel Aguilar Marroquín.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS  
DE PROMOCION, EN ESPECIAL

A: Udine R. Aragón, Alberto A. Chamorro,  
Mauricio Sapón, Hugo L. Tujab, José  
F. Vega, Erick E. Veras, Edwin Villa  
Nueva Cámara.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE AGRONOMIA.

## AGRADECIMIENTOS

- A: Ing. Agr. Rolando G. Aguilera      Por su valiosa asesoría en el desarrollo del presente trabajo.
- A: El Personal del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Agronomía.      Por su orientación en la preparación de la presente Investigación.
- A: Los compañeros Ingenieros Agrónomos, Rolando Barrios y Fernando Erazo Solares.      Por su colaboración prestada en la realización de la presente Investigación.
- A: La Familia Mayorga Girón      Por sus acertados consejos en la culminación del presente trabajo.
- A: Ingeniero Cristian Minondo      Por su desinteresada colaboración.

# C O N T E N I D O

Página

	RESUMEN	
I	INTRODUCCION	1
II	HIPOTESIS	3
III	OBJETIVOS	4
IV	REVISION DE LITERATURA	5
	4.1 Inoculantes y conservación de <u>Rhizobium</u>	5
	4.2 El ambiente y necesidad nutricionales del <u>Rhizobium</u>	7
	4.3 Adaptabilidad ecológica de <u>Rhizobium</u>	9
	4.4 Soportes	10
	4.5 Evaluación de supervivencia de <u>Rhizobium</u>	14
	4.6 Recuento de Rizobios viables	14
	4.7 Método de recuento de Miles y Misra	15
V	MATERIALES Y METODOS	16
	5.1 Sede de los experimentos	16
	5.2 Localización de las fuentes de soporte	16
	5.3 Análisis físico-químico de laboratorio para la selección de los soportes	17
	5.4 Determinación de tratamientos y diseño experimental	18
	5.5 Preparación de los soportes	18
	5.6 Preparación de la bacteria	19
	5.7 Impregnación de los soportes y maduración	20
	5.8 Evaluación de la sobrevivencia de rizobios	20
	5.9 Análisis estadístico y criterios de evaluación	23

		Página
VI	ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	25
VII	CONCLUSIONES	32
VIII	RECOMENDACIONES	33
IX	BIBLIOGRAFIA	34
X	APENDICE	36

#### INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características físico-químicas de los soportes.	18
2	Datos experimentales del conteo de rizobios en los diferentes soportes y en las diferentes fechas (expresados en células por gramo de soporte).	28
3	Análisis de varianza de los datos de población de rizobios, efectuados a los diferentes soportes en cada fecha de conteo.	29
4	Valores promedio de población de rizobios obtenidos en diferentes fechas de conteo, ordenados en forma descendente (expresado en células/gramo de soporte).	30

## APENDICE

Cuadro		Página
1	Ejemplo de un esquema de dilución en que se esperan aproximadamente $1 \times 10^9$ rizobios viables por gramo de soporte.	37
2	Medio BYMA (Brockwell Yeast Mannitol Agar).	38
3	Datos de la calibración de micropipetas para obtener el número de gotas contenidas en un volumen de 2 centímetros cúbicos y su correspondiente factor de corrección.	39
4	Datos de variación de valores de pH para los diferentes soportes, utilizando diferentes niveles de aplicación de $\text{CaCO}_3$ como neutralizador.	40
5	Resultados del conteo de número de colonias en la primera lectura.	41
6	Resultado del conteo de rizobios en la primera lectura.	42
7	Resultado del conteo de número de colonias en la segunda lectura.	43
8	Resultados del conteo de rizobios en la segunda lectura.	44
9	Resultados del número de colonias en la tercera lectura.	45
10	Resultados del número de rizobios en la tercera lectura.	46
11	Resultados del número de colonias en la cuarta lectura.	47
12	Resultados del conteo de rizobios en la cuarta lectura.	48
13	Resultados del número de colonias en la quinta lectura.	49

Cuadro		Página
14	Resultados del conteo de rizobios en la <u>quin</u> ta lectura.	50
15	Resultados del número de colonias en la sex- ta lectura.	51
16	Resultados del conteo de rizobios en la sex- ta lectura.	52

#### FIGURAS

1	Forma de identificación de la base de cada caja de petri.	23
2	Comportamiento gráfico de los soportes con relación Población - Tiempo.	31

EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE Rhizobium leguminosarum  
biovar phaseoli EN CUATRO SOPORTES NO ESTERILES,  
CON POTENCIAL PARA PREPARAR INOCULANTES.

SURVIVAL EVALUATION OF Rhizobium leguminosarum  
biovar phaseoli ON FOUR NON-STERILE CARRIERS,  
WITH INOCULANT PREPARATION POTENCIAL.

R E S U M E N

El presente estudio se efectuó con el fin de establecer cual de 4 soportes seleccionados permite la sobrevivencia a la cepa de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli TAL 1376, en poblaciones no menos de  $1 \times 10^7$  cel/gr de soporte inoculado por un tiempo no menor de 2 meses, para obtener así materiales de procedencia nacional que puedan servir como base para preparar inoculantes.

Se recolectaron 10 suelos que reportaban contenidos de materia orgánica arriba del 16%, seleccionándose 4 provenientes de los municipios Capellania y Chiantla (Huehuetenango); Chini que (Quiché) y Purulhá (Baja Verapaz) satisfaciendo las características físico-químicas para considerarse soportes.

La preparación de los soportes consistió en el secado, molido, tamizado neutralizado (pH) y empaquetado, Posteriormente el rejuvenecimiento de la cepa; hasta llevarla a una concentración celular mínima de  $1 \times 10^9$  cel/cc de dilución luego se efectuó el proceso de impregnación y maduración para almacenarlos a 26 °C.

La evaluación de la sobrevivencia se efectuó utilizando el método de conteo en platos propuesto por Miles y Misra realizando conteos cada 20 días para conocer la fluctuación de la población en cada soporte conforme aumentaba el tiempo, hasta un límite donde la población descendiera de  $1 \times 10^7$  cel/gr de soporte (considerado nivel mínimo de comercialización del inoculante).

El diseño estadístico empleado fue completamente al azar, utilizando 4 tratamientos con 3 repeticiones. De acuerdo al análisis estadístico e interpretación de resultados se demostró que los soportes con mayor contenido de materia orgánica y capacidad de retención de humedad mantienen poblaciones altas de rizobios por mayor tiempo, constituyéndose así la turba Purulhá como la de mayor sobrevivencia (83 días); seguido de Chiantla (59 días).

## I. INTRODUCCION

Debido al encarecimiento de la energía derivada de los hidrocarburos, se han buscado otras fuentes generadoras de la misma. La crisis energética, ocurrida en el año de 1974 puso en evidencia el peligro de depender exclusivamente de la utilización de los combustibles para la fabricación de los fertilizantes químicos, que requieren energía no renovable. Los precios de estas fuentes de energía pueden fluctuar caprichosamente en el mercado. Por estas razones las industrias de los inoculantes han adquirido gran importancia, debido al bajo precio con que se obtiene el Nitrógeno fijado biológicamente.

En los países en desarrollo y aún en los desarrollados la fijación biológica es un medio utilísimo para bajar los costos de producción de leguminosas y aunque en muchos casos la fijación se logra con el inóculo existente en los suelos, es preferiblemente aconsejable el uso de los inoculantes previamente evaluados con el tipo de leguminosas a sembrar. La inoculación requiere de la preparación cuidadosa de un inoculante. Una buena solución a estos problemas es la creación de plantas productoras de los mismos que puedan vender su producción a costos bajos, al alcance de los agricultores de escasos recursos. Lo ideal de una planta productora de inoculantes es que todos sus materiales que emplee, los adquiera en el país y no los compre en el exterior, ya que debido a su volumen el transporte resulta oneroso; y por lo tanto perdería su objetivo de producir a bajos costos.

Considerando que en Guatemala el cultivo de leguminosas es una de las prácticas más difundidas, es necesario proveer información que más adelante pueda ser utilizada con fines prácticos para desarrollar nuestra agricultura. El presente trabajo trata de dar a conocer fuentes de substratos que puedan ser utilizados como soportes para la inoculación de Rhizobium. Es de importancia

mencionar que el presente trabajo constituye el primer estudio sobre el tema, ya que en lo que respecta a la evolución de soportes para la preparación de inoculantes, no se había practicado anteriormente en el medio nacional un trabajo similar, por lo tanto no se cuenta con un historial sobre materiales y técnicas de soportes usados en otro estudio.

La investigación se realizó con el apoyo técnico y físico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a través de su personal especializado, instalaciones, materiales y equipo existente.

## II. HIPOTESIS

Todos los materiales empleados como soporte en condiciones no estériles, permiten la sobrevivencia a la cepa de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli, en poblaciones de no menos de  $1 \times 10^7$  células por gramo de soporte inoculado por un tiempo no menor de dos meses.

### III. OBJETIVOS

Obtener uno o más materiales de soporte de procedencia nacional que pueda servir para la preparación de inoculantes de Rhizobium.

#### IV. REVISION DE LITERATURA

##### 4.1 INOCULANTES Y CONSERVACION DE Rhizobium

La industria de los inoculantes para leguminosas tuvo su origen a principios del año 1900, pero fue hasta después del año 1925 que se prestó más atención al uso de estos productos en el desarrollo de la agricultura. Ultimamente ha adquirido gran importancia debido al aumento de las áreas sembradas con leguminosa.

Existen diferentes métodos para la producción de inoculantes, a escala industrial el de mayor aplicación es el que consiste en desarrollar a la cepa de Rhizobium en un medio líquido y la posterior impregnación de un soporte con la suspensión bacteriana ( 4 ).

Según Baleti ( 2 ), las etapas fundamentales que deben ser consideradas en la preparación de inoculantes son las siguientes:

- a. Obtención de caldos de Rhizobium de concentraciones superiores a  $1 \times 10^9$  células por mililitro. Las cepas seleccionadas deben presentar alto poder de invasividad y capacidad de fijación de Nitrógeno.
- b. Disponer de un buen soporte que permita su impregnación.
- c. Disponer de las técnicas e instalaciones para efectuar los controles durante el proceso y asegurar la calidad del producto antes de ser destinado a la venta.

Para el mantenimiento de Rhizobium los métodos de conservación mas utilizados que podemos mencionar son:

- a. En tierra estéril; según Vela citado por Balatti ( 2 ), si bien la tierra estéril se ha aplicado con éxito a microorganismos que esporulan, no es un método muy recomendado para el género Rhizobium, sin embargo se puede mantener en períodos de tres a cuatro años cepas de Rhizobium en mezcla de turba de suelo.
- b. Por congelamiento; según Perlman citado por Balatti ( 2 ), con motivo del mejoramiento y disponibilidad de las técnicas de congelamiento y poseer  $N_2$  líquido, éste método es la elección para el mantenimiento de microorganismos. La desventaja de este método es que el  $N_2$  líquido es relativamente caro.
- c. Liofilización o Secado por Congelamiento; según Kackley, citado por Balatti (2), es el método más indicado con todos los microorganismos. Su ventaja es que la mayor parte de microorganismos sobreviven al secado, y el cultivo es fácilmente almacenado. La mayoría de estos preparados liofilizados pueden ser mantenidos a la temperatura ambiente.
- d. Cultivos en Agar: Fueron los primeros inoculantes que aparecieron en el mercado. En la década del 20 se reemplazaron por inoculantes de base sólida en Estados Unidos, en 1952 en Australia y en 1964 en Uruguay principalmente por la alta tasa de mortalidad durante el secado, luego de su aplicación en semilla.

En algunos países se utiliza todavía para solicitudes concretas de inoculantes, pero su uso restringe fundamentalmente a cubrir la demanda de investigación. En este caso se utilizan directamente o para preparar inoculantes en base

sólida (8).

- e. Cultivos impregnados al vacío; la semilla actúa como soporte y la cubierta ofrece protección a la bacteria. Se utilizan cultivos congelados de alta concentración. El cultivo se descongela y se añade a la semilla. El proceso se realiza al vacío. La bacteria penetra a la semilla a través del micrópilo y por poros o hendiduras propias de la cubierta seminal. El proceso ofrece ventajas al industrial y al agricultor, pero la sobrevivencia es pobre (8).
- f. Cultivos en aceite; cultivos de Rhizobium en medio líquido se concentran por centrifugación y liofilización y se suspenden normalmente en aceite de maní. El aceite se calienta previamente a 120°C, Centrifugados durante 12 horas para obtenerlos libre de agua y rizobios (8).

#### 4.2 EL AMBIENTE Y NECESIDAD NUTRICIONALES DEL Rhizobium

El Rhizobium al igual que otros microorganismos requiere de un ambiente y nutrición que en la mayoría de los casos es específico a cada uno. Cuando en el laboratorio se quieren multiplicar los microbios es necesario crearles un ambiente y medio adecuados para la nutrición. Estos medios generalmente consisten en una asociación cualitativa y cuantitativa equilibrada de nutrientes que por su naturaleza permiten el crecimiento de microorganismos fuera de su hábitat natural en su ambiente. Algunos medios están constituidos por soluciones de sales inorgánicas. Otros son preparados por ingredientes orgánicos de naturaleza compleja (5).

Los requerimientos metabólicos que el Rhizobium necesita utilizar como fuente de Carbono son: polyalcoholes monosacáridos y ascáridos simples.

Las bacterias inoculadas en un medio de cultivo absorben selectivamente los nutrientes del medio y los convierten en nuevas sustancias celulares como ARN, ADN, proteínas, enzimas y otros macromoléculas.

El Rhizobium siendo bacteria aeróbica, químico-organo heterotrófica, crece bien en un medio complejo conteniendo extracto de levadura. Esta bacteria puede usar fuentes de Nitrógeno diversas como son:  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ , aminoácidos y  $\text{N}_2$  cuando en simbiosis con la planta hidroliza la caseína.

En cuanto a requerimientos vitamínicos, se han hecho estudios con gran número de cepas y se ha demostrado que el grupo Rhizobium leguminosarum, Rhizobium trifolii, Rhizobium phaseoli; requieren el agregado de una o más vitaminas, biotina, tiamina y pantotenato de calcio (10).

Respecto a fuentes minerales; Lowe citado por Balatti (2), ha destacado la importancia del agregado de magnesio, fósforo, hierro y calcio; así como también cobalto que es utilizado por algunas cepas para sintetizar citamina  $\text{B}_{12}$ . El fósforo es generalmente suministrado en forma de fosfato inorgánico. El contenido de fósforo en la célula bacteriana es alrededor de 1.5% de biomasa seca, pero este porcentaje aumenta con la velocidad de crecimiento y varía inversamente con la temperatura. Esta variación se refleja en el contenido de ARN de las células (2).

Vincent (16), da los datos de requerimiento en elementos minerales para varios rizobios:

<u>Elemento</u>	<u>Requerimiento</u>	<u>10<sup>-3</sup></u>	<u>u</u>
Fe . . . . .	0.005	-	0.100
Mg . . . . .	0.100		
Ca . . . . .	0.025		
Mg + Ca . . . . .	0.500		
Co . . . . .	0.00001		
Zn . . . . .	0.0001	-	0.001
Mn . . . . .	0.0001	-	0.010
K . . . . .	0.0500		

La deficiencia de Ca - Mg en un medio puede conducir a la pérdida de viabilidad de la célula. También la deficiencia de Ca puede conducir a la deformación de la morfología de la célula, que muestra la posibilidad de tener una función en la pared celular. El Fe es necesario para la síntesis de hemoproteína y para la nitrogenasa (10).

#### 4.3 ADAPTABILIDAD ECOLOGICA DEL Rhizobium

De acuerdo a las condiciones ambientales particulares donde la simbiosis se desarrolle, las cepas de Rhizobium deben reunir requerimientos específicos para asegurar el establecimiento y persistencia de la simbiosis en el campo, frecuentemente el objetivo del programa de selección es; elegir cepas tolerantes a conciciones específicas, como: pH, salinidad, temperatura, habilidad para fijar nitrógeno, etc. (9).

Dentro de los principales factores que influyen en la adaptabilidad de los rizobios de un medio nutritivo artificial al suelo, vale la pena considerar lo siguiente:

- a. Posibilidad de sobrevivencia del rizobio en la semilla inoculada; las cepas de Rhizobium seleccionadas tienen que ser capaces de sobrevivir

en semilla inoculada estableciendo simbiosis aún en condiciones de stress.

- b. Competencia saprofítica; los efectos suelen ser estimulativos o inhibitorios, los rizobios pueden ser afectados por todo tipo de antagonismos, como: predación, competencia y parasitismo. Existen también efectos indirectos nocivos, como: nemátodos y patógenos de plantas; así como benéficos: micorrizas. Muchas de las leguminosas son incluso dependientes de micorrizas (15).
- c. Estabilidad genética; es muy importante la información existente sobre la inestabilidad genética en cepas de Rhizobium y sobre la dificultad experimentada en el mantenimiento exitoso de los cultivos utilizados en la producción comercial de inoculantes (8).

#### 4.4 SOPORTES

Con los caldos obtenidos una vez completado el proceso fermentativo generalmente se impregnan materiales en estado de polvo fino denominados soportes. El uso de dichos soportes ha permitido resolver en forma simple y económica el problema de distribución y fundamentalmente aumentar el tiempo de sobrevivencia de rizobios.

Entre los soportes que han utilizado para la preparación de inóculos, según Roughley y Van Shreven; citados por Balatti (2), merecen citarse: Turba, diferentes clases de suelo, piedra pómez, vermiculita, etc. De todos ellos el más empleado es la turba.

Este material de origen vegetal, generalmente se presenta con un pH bajo. En este caso se modifi-

ca convenientemente por el agregado de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  en concentraciones de hasta un 10%, con el fin de llevar el pH a valores cercanos a la neutralidad. El análisis químico de las turbas no permite por sí solo predecir su comportamiento como material de soporte, la única forma de establecer el comportamiento de la turba consiste en evaluar frente a cada una de las cepas de Rhizobium la sobrevivencia de esta. Las diferencias observadas en las diferentes turbas pueden ser atribuídas al distinto origen botánico, a la edad de la turba, a la capacidad de retención de humedad, a la microflora presente, a la presencia de inhibidores, etc. (3).

Lopreto, citado por Balatti y Mazza (3), mencionan que los análisis que se le hacen a las turbas, tanto físicos como químicos, incluyen: Capacidad hídrica, pH, humedad higroscópica y contenido de calcio.

La turba antes de ser impregnada con el caldo de fermentación debe ser secada y molida (malla de tamiz 150 - 200 mesh).

El secado de la turba además de favorecer la operación de mayor cantidad de molienda, permite la incorporación de mayor cantidad de caldo de cultivo, y reduce la microflora nativa de la misma. Se recomienda efectuar el secado a temperatura no mayor de 100 °C. y reducir la humedad hasta aproximadamente un 9%. La turba una vez impregnada con los caldos llega a un valor de humedad que puede estar comprendido entre el 50% a 60%. Una propiedad muy importante de la turba, además de permitir una buena sobrevivencia, es que tenga una alta capacidad de retención de agua (2).

En un trabajo realizado por Lopreto, citado por Balatti (3), utilizaron solos o mezclas de distintos tipos de suelos y turbas de yacimientos que se encuentran en la provincia de Mendoza (República de Argentina) y demostró que los soportes empleados presentaron un buen comportamiento para la supervivencia y la capacidad de nodulación de Rhizobium japonicum E-45. Luego de considerar las propiedades de diferentes muestras de turbas, se seleccionaron las provenientes de Tierra de Fuego por presentar alta capacidad de retención de humedad (superiores al 100%).

Se mencionó anteriormente el hecho de que numerosos materiales pueden ser usados como soportes; en Argentina, Lopreto (9), menciona que se emplean como soportes: Turbas de Mendoza (Campo de los Andes); suelos arcillosos de City Bell, La Plata, Provincia de Buenos Aires; materiales de descomposición del Río de la Plata (rezasa de Barazateguí); turba de origen holandés (comerciable en la República de Argentina) y carbón vegetal.

Balatti y Mazza (3), dicen que una serie de trabajos han demostrado plenamente el buen empleo de soportes estériles en la operación de inoculantes, en razón de que aseguran una mayor concentración de células viables en función del tiempo. Hasta el presente se ha utilizado la esterilización por vapor y con radiaciones.

Robinson, citado por Aguilera (1), define la turba como "suelos en los cuales los residuos de la vegetación natural han sido humificados más bien que oxidados".

Las turbas se caracterizan por la gran propor-

ción de materia orgánica que contienen. Las turbas típicas (mulch) contienen por regla general, por lo menos el 50% de materia orgánica y estas pueden encontrarse tanto en lugares fríos, templados así como en los trópicos, poniendo como ejemplo de los últimos, los manglares (1).

Además clasifican las turbas de la manera siguiente:

- a. Turbas de montaña y Climáticas; se forman a lo largo de pendientes por las cuales el agua fluye constantemente de fuentes en terrenos más elevados. Ninguna de las turbas dependen de la topografía, sino de las condiciones ambientales.
- b. Turbas de Brezo o Forestales; que se deben a la acumulación de humus en la superficie de los suelos de brezo forestal.

Las turbas de montaña y climáticas se caracterizan porque el tipo de descomposición es anaeróbica, a diferencia de las forestales que se efectúa en medios aeróbicos.

Según Konova, Nowakowski y Neuman, citados por Aguilera (1), los compuestos que generalmente existen en las turbas o suelos de turba son: ácido húmico, crénico, apocrénico, humínico y ulmin. Dicen que las auxinas y vitaminas que existen en el suelo son provenientes de las plantas incorporadas a él, entre las auxinas estan: Acido 3 indolacético, gibberelinas, ácido dicarboxílico, ácido succínico, ácido cinamírico, ácido fumárico y otros; entre las vitaminas: Vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido pantoténico, fólico, nucleotínico, P-aminobenzóico, rivo flavina, biotina y otros.

#### 4.5 EVALUACION DE SUPERVIVENCIA DE Rhizobium

Existen varios métodos para evaluar la sobrevivencia de Rhizobium, entre ellos estan:

Método del Número Más Probable (NMP) discutido y preparado por Halvorson y Ziegler (1933) y por Cochran (1950), citados por Tarouco (13); permite estimar la población bacteriana del inoculante u otro material sin contar las células o colonias. Este método depende de la capacidad del rizobio específico en producir nódulos en la leguminosa hospedera. Para estimar el tamaño de la población de rizobios específicos se usa una serie de diluciones en la muestra a analizar y se observa en cuales ocurre la formación de nódulos. Las plantas probadoras deben estar desarrolladas en condiciones controladas de temperatura, luminosidad y asepsia. Los resultados se obtienen en 20 a 30 días (13).

#### 4.6 RECUENTO DE RIZOBIOS VIABLES

El recuento en cajas requiere la preparación de una serie de diluciones, para poder obtener con alguna de ellas entre 30 a 300 colonias. Deben tomarse precauciones para asegurar una dispersión homogénea inicial, la retención de la viabilidad en el líquido de las diluciones y una relación correcta entre las diluciones sucesivas. Se logran resultados positivos mediante el simple procedimiento de agitación.

Para recuentos regulares en cajas de suspensiones de rizobios puros se incorporan al medio agarizado, alícuotas de 1 cc. Cuando se desea que todas las colonias esten sobre la superficie del agar, se extiende un volumen menor de la suspensión diluida sobre la superficie del agar, del que se habrá desa-

lojado previamente el exceso de agua dejando las cajas recién preparadas durante una noche a 37 °C en la incubadora de cultivo. También puede usarse el método de las gotas de Miles y Misra (1938) (vérr párrafo sig.) para estudiar distintas diluciones y simplemente colonias superficiales sobre una caja.

#### METODO DE RECUESTO DE MILES Y MISRA

(Recuento en cajas por gotas)

Para efectuar el conteo usando este método se colocan cajas petri con agar en las que se limitan 4 sectores de la misma que a su vez servirán como repetición del conteo. Se eligen las diluciones de rizobios, por lo general, ésta será una dilución menor que la que se usa para el recuento común en placas. Luego se siembra el sector correspondiente de cada una de las cajas, cada uno con una sola gota de la dilución elegida, dejándola caer desde una altura de 2.5 cms de tal manera que se extiende sobre una área aproximada de 2 cms. Se incuba en posición invertida a 26 - 28 °C durante 4 a 5 días para los rizobios más rápidos y durante un lapso de hasta 10 días para los más lentos.

Se efectúan entonces los recuentos en las áreas de las gotas que muestran la mayor cantidad de colonias claramente diferenciadas (no confluentes).

El promedio de los recuentos repetidos de una dilución da el recuento viable de 0.02 cc de la misma y deberá multiplicarse por el factor de corrección de cada micropipeta para obtener la cantidad por cc. Para promedios y con fines estadísticos, los valores deben convertirse a logaritmos (base 10) (16).

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 SEDE DE LOS EXPERIMENTOS

El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología y de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, situada en la Ciudad Universitaria zona 12 en la ciudad de Guatemala. Para el efecto se siguieron varios pasos, siendo los siguientes:

- 5.2 Localización de las fuentes de soportes.
- 5.3 Análisis físico-químico de laboratorio para la selección de los soportes.
- 5.4 Determinación de tratamientos y diseño experimental.
- 5.5 Preparación de los soportes.
- 5.6 Preparación de la bacteria.
- 5.7 Impregnación del soporte y maduración.
- 5.8 Evaluación de la sobrevivencia de rizobios en el soporte.
- 5.9 Análisis estadístico y criterios de evaluación.

### 5.2 LOCALIZACION DE LAS FUENTES DE SOPORTE

Tomando en cuenta que los materiales de origen orgánico, ricos en nutrimentos, se consideran como buenos soportes; en el presente trabajo se evaluaron este tipo de materiales.

Para esta fase del trabajo se revisó en el libro, "Clasificación de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala", de Simons, Tarano y Pinto (12), la información de los suelos que reportaban en el país, contenidos de materia orgánica arriba del 16%. Esto permitió muestrear y traer suelos que presentaron en su horizonte una capa mayor de 20 centímetros de profundidad de materia orgánica, siendo las siguientes:

Tipo de suelo	Departamento	Municipio
1. Balanjuyú franco	Chimaltenango	Tecpán
2. Carchá franco limoso	Alta Verapaz	Santa Cruz
3. Cavijá franco limoso	Quiché	Chinique
4. Moyuta franco limoso	Jutiapa	Jalpatagua
5. Patsité franco arenoso	Quiché	Chiché
6. Soloma franco	Huehuetenango	San Juan Ixcov
7. Toquiá franco	Huehuetenango	Chiantla
8. Soloma franco	Huehuetenango	Capellanía
9. Totonicapán franco	Totonicapán	Totonicapán
10. Tamahú	Baja Verapaz	Purulhá

De los anteriores suelos fueron seleccionados cuatro con las características que más se aproximaron al ideal recomendado en la literatura, para la preparación de inóculos (12).

### 5.3 ANALISIS FISICO-QUIMICO DE LABORATORIO PARA LA SELECCION DE LOS SOPORTES.

De los anteriores suelos fueron seleccionados los cuatro con las características que más se aproximaron al ideal recomendado, por lo tanto se escogieron los que a través del análisis de laboratorio llenaban el requisito de tener más del 16% de materia orgánica y de los cuales se consignan a continuación las características físico-químicas que interesan para el estudio (14):

Cuadro 1. Características físico-químicas de los soportes.

Procedencia	Color	Textura	% M.O.	% CRH	pH
Purulá	Café muy oscuro	Franco friable	60.70	100	5.50
Capellanía	Café muy oscuro	Franco friable	16.67	93	5.85
Chiantla	Café muy oscuro a negro	Franco limoso friable	18.56	80	6.40
Chinique	Café oscuro	Franco friable	16.94	73	6.20

%M.O. = Porcentaje de materia orgánica

% CRH = Porcentaje de Capacidad de Retención de Humedad

pH = pH inicial

#### 5.4 DETERMINACION DE TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los tratamientos seleccionados estuvieron constituidos por cuatro soportes evaluados, debidamente impregnados de la bacteria a los que se les efectuó cultivos cada 20 días para conocer la fluctuación de la población en cada soporte conforme aumentaba el tiempo hasta un límite donde la población de rizobios descendiera de  $1 \times 10^7$  células/gramo de soporte (considerado como el nivel mínimo de comercialización inoculante).

El diseño del experimento fue al completo azar, utilizando 3 repeticiones, que a su vez se constituyeron cada una por el resultado promedio de 4 sub-unidades, producto de una serie de diluciones programadas ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$ ).

#### 5.5 PREPARACION DE LOS SOPORTES

Para preparar los soporte fue necesario efectuar los pasos siguientes:

#### 5.5.1 Acondicionamiento del pH

Para este paso fue necesario neutralizar la acidez de los soportes (Apéndice 4), para lo cual a cada soporte le fueron efectuados aplicaciones progresivas de Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) necesario para neutralizar y medir de esta forma el incremento total de  $\text{CaCO}_3$  para neutralizar una cantidad determinada de soporte.

Los anteriores análisis se efectuaron en los laboratorios de Edafología de la Facultad de Agronomía.

#### 5.5.2 Secado de los soportes

El secado se efectuó utilizando el horno a convección de aire y para el mismo se sometió el soporte a una temperatura de  $80^\circ\text{C}$  durante dos días hasta que el mismo presentó entre 5 y 7% de humedad.

#### 5.5.3 Molido

El molido se efectuó una vez que el soporte se encontraba seco tamizándolo en malla de 200 mesh lo que proporcionó un polvo sumamente fino.

#### 5.5.4 Empaque

El polvo fino de soporte fue empaquetado en bolsas plásticas de 15 micrones de grosor en volúmenes de 50 gramos y almacenados a temperatura ambiente.

### 5.6 PREPARACION DE LA BACTERIA

Para la preparación de la bacteria se procedió al rejuvenecimiento de la cepa de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli TAL 1376, en tubos de ensayo con agar inclinado usando medio BYMA (Apéndice 2) y a los cuatro días de desarrollada se inoculó en 3 erlenmeyer

con 125 cc de caldo nutritivo BYM (medio BYMA sin agar) colocándola en un agitador magnético durante aproximadamente 72 horas hasta que la población alcanzó un número alto de rizobios por cc de medio nutritivo ( $1.7 \times 10^9$  rizobios/cc de medio nutritivo).

Previo a la impregnación del soporte (etapa 5.7.) se analizó la pureza y calidad del caldo del cultivo utilizando para ello la siguiente técnica:

Observación de un frotis con tinción de Gram; el cual mostró bacilos de gram negativos, libres de células gram positivas.

El recuento total de bacterias, para lo cual se preparó una dilución de caldos de cultivo con relación 1:1000. La muestra se observó en la cámara de Petroff proporcionándonos en forma directa el número de células por centímetro cúbico del caldo nutritivo, mismo que fue de  $1.7 \times 10^9$ .

#### 5.7 IMPREGNACION DE LOS SOPORTES Y MADURACION

Los soportes secados, molidos, neutralizados y empaquetados se impregnaron con el caldo de cultivo de Rhizobium laguminosarum biovar phaseoli TAL 1376 a una concentración celular mínima de  $1.7 \times 10^9$  células por gramo de soporte. La impregnación se realizó en forma tal de lograr un producto con un contenido final de humedad que no sobrepasó el 50%. Los inoculantes así preparados fueron sometidos a un proceso de maduración durante 15 días a la temperatura de 26° centígrados en una incubadora.

Finalizando este período, los inoculantes estuvieron listos para iniciar los conteos de bacterias.

#### 5.8 EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE RIZOBIOS.

Se efectuó utilizando el método de conteo en pla-

tos, propuesto por MILES MISRA (16) que se detalla a continuación:

#### 5.8.1 Evaluación de diluciones

Por cada soporte a emplear se tomaron dos frascos de 150 mililitros en los cuales se colocaron 99 cc. de agua estéril, así también fue necesario esterilizar cuatro tubos de ensayo con tapa de rosca con 9 cc de agua cada uno.

Para iniciar las diluciones se tomó un gramo de la muestra a estudiar (inoculante) y se colocó en el primer frasco con 99 cc. de agua, en seguida se agitó y con pipetas estériles y en forma sucesiva se trasladó de este primer frasco al segundo, del segundo al tercero que sería un tubo de ensayo con 9 ml., y así sucesivamente 1 ml. en cada paso obteniendo así cuatro diluciones de la suspensión iniciada (ver cuadro 1 del apéndice)

#### 5.8.2 Preparación de las cajas

Utilizando el medio específico de Rhizobium denominado BYMA (ver cuadro 2 del apéndice), se prepararon las cajas de Petri necesarias para la prueba, las cuales previo al llenado con el medio de cultivo fueron esterilizadas.

#### 5.8.3 Preparación de las micropipetas

Para el efecto se emplearon 50 micropipetas con una tetina de goma, habiéndose numerado del 1 al 50, a continuación se calibraron para establecer cual era el tamaño de la gota de cada pipeta. Para obtener mayor precisión se calibraron 3 veces cada una, habiéndose tomado el valor promedio al final. Esta práctica se realizó contando las gotas que constituían 2 ml. en una probeta aforada. De lo anterior

se obtuvo un factor de corrección para cada micropipeta, dividiendo los dos mililitros dentro del número de gotas (ver cuadro 3 del apéndice).

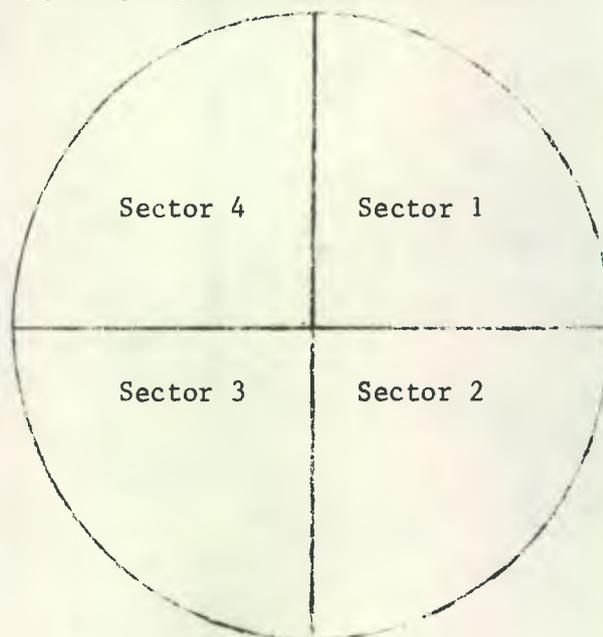
Continuando con el procedimiento se colocaron las cajas con el medio BYMA en grupos de tres para cada dilución ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  = 12 cajas), esto para cada turba, pero antes de sembrarlas se dividió cada una en su base en cuatro sectores, usando para ello un marcador de tinta (cada sector de la caja constituyó en éste método una repetición dentro de la misma dilución, lo que permitió entonces 4 réplicas por dilución; ver figura 1.

La siembra se efectuó entonces en el sector correspondiente de cada caja con una sola gota de la pipeta aforada con la dilución escogida, dejándola caer una altura de aproximadamente 2.5 cms. de tal manera que se extendiera sobre una área aproximadamente de 2 cms.

Efectuada la siembra se incubó la bacteria poniendo la caja en posición invertida de 26 a 28°C durante 4 a 5 días, y luego se efectuaron los recuentos en las áreas de las gotas que mostraron la mayor cantidad de colonias claramente diferenciadas (no confluyentes).

El promedio de los recuentos repetidos de una dilución dá el recuento viable en el volumen de la gota calibrada que debió multiplicarse por el factor de corrección de cada pipeta, a fin de obtener la cantidad de rizobios por gramo inoculante.

Figura 1. Forma de identificación de la base de cada caja petri



#### 5.9 ANALISIS ESTADISTICO Y CRITERIOS DE EVALUACION

Para la evaluación del trabajo se consideró convenientemente efectuar un análisis de varianza que siguiera el modelo experimental aplicado, es decir un análisis para completo azar en cada fecha de conteo, complementando este análisis con una interpretación gráfica de la respuesta de cada turba conforme transcurrió el tiempo.

El análisis estadístico siguió el siguiente modelo (4)

$$Y_i = U + T_i + E_i$$

En donde:

U = efecto de la media general.

T<sub>i</sub> = efecto de la i-ésima modalidad del factor T.

E<sub>i</sub> = efecto del error experimental asociada a la i-ésima unidad experimental

Por otro lado fue necesario establecer un criterio que definiera cual debía ser el punto tope, de los conteos de bacterias en cada inoculante y para ello se siguieron las normas internacionales de evaluación de calidad de inoculantes, las cuales establecen como criterio lo expresado en la siguiente tabla (13).

INOCULANTES POBRES	$1 \times 10^7$	*
INOCULANTES DUDOSOS	$1 \times 10^8$	*
INOCULANTES SATISFACTORIOS	$1 \times 10^9$	*
INOCULANTES MUY SATISFACTORIOS	$1 \times 10^9$	*

\* Rizobios por gramo de inoculante.

Tal como se expresa anteriormente, en el momento que cualquiera de los materiales evaluados presentasen una población igual o menor de  $1 \times 10^7$  rizobios por gramo de inoculante, dejó de ser considerado material de estudio (14).

## VI. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

El análisis y discusión de resultados de los soportes evaluados, tal como se planificó se basó en los tres puntos de apoyo siguientes:

- a. Análisis estadístico
- b. Representación gráfica
- c. Normas Internacionales de Evaluación.

En el cuadro 2 se presentan los datos experimentales de cada uno de los diferentes conteos de rizobios efectuados, mismos que en total fueron 6 (16 de Julio, 5 de Agosto, 26 de Agosto, 16 de Septiembre, 6 de Octubre y 26 de Octubre de 1987), esto permitió establecer paso a paso las variaciones que la población presentó en cada soporte mientras transcurrió el tiempo, para evaluar estadísticamente el comportamiento de cada soporte, se efectuó un análisis de varianza en cada fecha mostrando los resultados, que existían diferencias estadísticas con significancia del 5% en las cuatro lecturas iniciales y no así en las últimas dos, debido a que las poblaciones de rizobios habían bajado a niveles muy por debajo de los valores de dilución empleados en los conteos (Cuadro 3).

Los valores promedio de cada soporte, se presentan ordenados de más a menos población en las cuatro fechas iniciales de conteo en el cuadro 4, y en la figura 2 aparecen gráficamente las tendencias de la población en el tiempo.

En el primer conteo efectuado 17 días después de la maduración de la bacteria en los soportes, se encontró que existían dos grupos estadísticamente diferentes; en uno se agrupo Capellanía, Purulhá y Chiantla con los valores más altos, y en otro Chiantla y Chinique con los mas bajos. Los cuatro soportes presentaron un comportamiento

esperado, pues todos incrementaron el número de células rizobiales por gramo de soporte, aunque el incremento no fue muy marcado en el suelo Chinique (Fig. 2).

En el segundo conteo los valores promedio de los cuatro soportes se dividió en tres grupos, el primero lo comprendió la turba Purulhá con la población más alta; luego Chiantla, posteriormente el grupo conformado por Capellania y Chinique. Dado el nivel de temperatura al que se sometió cada soporte inoculado ( $26^{\circ}$  C temperatura aproximada a la de manejo en bodegas y comercios agrícolas de nuestro medio), se esperó una breve estabilización de la población o el inicio al descenso de la misma, sucediéndose lo último expresado (Fig. 2). Los soportes Chinique con la más baja población en el primer conteo; y Capellania descendieron bruscamente casi al valor mínimo de utilización ( $1 \times 10^7$  cel/gr de soporte), el efecto observado se supone que se debió al efecto de la temperatura de manejo que indiscutiblemente ocasionó una constante actividad bacteriana, deshidratación de los soportes y una posible falta de nutrientes básicos en ambos suelos, coincidentemente el valor de la materia orgánica era más baja que en los otros soportes y esta situación se relaciona con la riqueza nutricional de un subtrato para la vida microbiana.

En el tercer conteo Purulhá mantuvo la población más alta, seguido de Chiantla que estaba muy cerca del nivel de  $1 \times 10^7$  cel/gr de soporte y por último, abajo de este nivel Capellania y Chinique.

La disminución de la población siguió el orden lógico que se planteó para Capellania y Chinique, es decir Purulhá con alto contenido de materia orgánica (60.7%) y mayor capacidad de retención de humedad (100%) se mantenía aún útil; y Chiantla con 18.6% de materia orgánica caía.

En el cuarto conteo Purulhá, Capellanía y Chiantla conformaron un grupo, probablemente debido a que Chinique ya no mostró población de rizobios, aunque es de aclarar que únicamente Purulhá manifestó poblaciones en este conteo que lo hacían útil como inoculante, en contraste con el resto que andaba ya con los niveles de población muy por debajo de  $1 \times 10^7$  rizobios/gr de inoculante.

A partir de la cuarta lectura los cuatro soportes dejaron de ser objeto de estudio debido a que las poblaciones descendieron de nivel mínimo establecido por las normas de calidad.

Los rangos de sobrevivencia se analizaron fácilmente ya que con el apoyo gráfico, (Fig. 2) se trazó una línea horizontal que cortó las curvas donde la población se encuentra en  $1 \times 10^7$  rizobios/gr de inoculante. La proyección de esta línea sobre el tiempo de utilidad de cada soporte, nos mostró que el suelo de Chinique es útil para 39 días, Capellanía por 41 días, Chiantla por 59 días y por último Purulhá 83 días.

Cuadro 2 Datos experimentales del conteo de rizobios en los diferentes soportes y en las diferentes fechas (expresados en células por gramo de soporte)

SOPORTES	FECHA DE LECTURA	R E P E T I C I O N E S			PROMEDIO
		I	II	III	
Purulhá	16/07/87	$5.320 \times 10^9$	$7.117 \times 10^9$	$9.588 \times 10^9$	$7.340 \times 10^9$
	05/08/87	$2.127 \times 10^9$	$2.060 \times 10^9$	$1.675 \times 10^9$	$2.090 \times 10^9$
	26/08/87	$4.575 \times 10^8$	$3.267 \times 10^8$	$2.747 \times 10^9$	$3.530 \times 10^8$
	16/09/87	$4.300 \times 10^7$	$1.900 \times 10^7$	$2.300 \times 10^7$	$2.830 \times 10^7$
	16/10/87	$2.000 \times 10^5$	$1.910 \times 10^6$	0.000000	$2.100 \times 10^6$
	26/10/87	$1.900 \times 10^5$	$1.90 \times 10^5$	0.000000	$1.207 \times 10^5$
Capellanía	16/07/87	$6.847 \times 10^9$	$10.20 \times 10^9$	$9.973 \times 10^9$	$9.007 \times 10^9$
	05/08/87	$8.600 \times 10^6$	$1.100 \times 10^7$	$1.860 \times 10^7$	$1.270 \times 10^7$
	26/08/87	$3.940 \times 10^6$	$1.158 \times 10^6$	$7.890 \times 10^5$	$2.100 \times 10^6$
	16/09/87	$2.100 \times 10^6$	0.000000	$7.500 \times 10^5$	$9.500 \times 10^5$
	06/10/87	0.000000	0.000000	$7.600 \times 10^5$	$2.500 \times 10^5$
	26/10/87	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Chiantla	16/07/87	$7.055 \times 10^9$	$3.392 \times 10^9$	$7.943 \times 10^9$	$6.130 \times 10^9$
	05/08/87	$6.690 \times 10^7$	$2.900 \times 10^8$	$1.160 \times 10^8$	$1.580 \times 10^8$
	26/08/87	$3.000 \times 10^6$	$1.500 \times 10^6$	$4.135 \times 10^7$	$1.520 \times 10^7$
	16/09/87	0.000000	0.000000	$1.500 \times 10^6$	$5.000 \times 10^5$
	06/10/87	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	26/10/87	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
Chinique	16/07/87	$1.931 \times 10^9$	$3.165 \times 10^9$	$2.413 \times 10^9$	$2.500 \times 10^9$
	05/08/87	$1.250 \times 10^7$	$7.730 \times 10^6$	$1.172 \times 10^7$	$1.100 \times 10^7$
	26/08/87	$7.700 \times 10^5$	$7.700 \times 10^5$	$7.700 \times 10^5$	$7.700 \times 10^5$
	16/09/87	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	16/10/87	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	26/10/87	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Cuadro 3 Análisis de varianza de los datos de población de rizobios, efectuados a los diferentes soportes en cada fecha de conteo.

Primer conteo de fecha 16 - 07 - 87					
F-V	G-L	Suma de Cadrados	Cuadrado Medio	F. Calculada	Significancia
BLOQUE	2	0.220215	0.110	1.099	0.3935 *
TRATAM	3	2.849610	0.950	9.482	0.0116 *
ERROR	6	0.601074	0.100		
TOTAL	11	6.370899			
Coeficiente de Variación: 1.4116 %					
Segundo Conteo de fecha 05 - 08 - 87					
F-V	G-L	Suma de Cuadrados	Cuadro Medio	F. Calculada	Significancia
BLOQUE	2	0.253174	0.127	0.567	0.5991
TRATAM	3	55.688720	18.563	82.870	0.0002 *
ERROR	6	1.343994	0.224		
TOTAL	11	57.285890			
Coeficiente de Variación: 2.6078 %					
Tercer conteo de fecha 26 - 08 - 87					
F-V	G-L	Suma de Cuadrados	Cuadro Medio	F. Calculada	Significancia
BLOQUE	2	0.867920	0.434	0.388	0.6975
TRATAM	3	66.510010	22.170	19.812	0.0024 *
ERROR	6	6.714112	1.119		
TOTAL	11	74.092050			
Coeficiente de variación: 6.7072 %					
Cuarto conteo de fecha 16 - 09 - 87					
F-V	G-L	Suma de Cuadrados	Cuadro Medio	F. Calculada	Significancia
BLOQUE	2	97.907960	48.954	1.735	0.2541 *
TRATAM	3	477.162700	159.054	5.638	0.0356 *
ERROR	6	169.275000	28.213		
TOTAL	11	744.345600			
Coeficiente de variación: 68.1011 %					

\* Existe diferencia significativa al 5% de probabilidad.

Cuadro 4 Valores promedio de población de rizobios obtenidos en diferentes fechas de conteo, ordenados en forma descendente (expresado en células/gramo de soporte).

1o. Conteo de fecha 16-7-87	
Soporte	Promedio*
CAPELLANIA	$9.007 \times 10^9$
PURULHA	$7.340 \times 10^9$
CHIANTLA	$6.130 \times 10^9$
CHINIQUE	$2.500 \times 10^9$

2o. Conteo de fecha 05-8-87	
Soporte	Promedio*
PURULHA	$2.090 \times 10^9$
CHIANTLA	$1.580 \times 10^8$
CAPELLANIA	$1.270 \times 10^7$
CHINIQUE	$1.100 \times 10^7$

3o. Conteo de fecha 26-8-87	
Soporte	Promedio*
PURULHA	$3.530 \times 10^8$
CHIANTLA	$1.520 \times 10^7$
CAPELLANIA	$2.100 \times 10^6$
CHINIQUE	$7.700 \times 10^5$

4o. Conteo de fecha 16-9-87	
Soporte	Promedio*
PURULHA	$2.830 \times 10^7$
CAPELLANIA	$9.500 \times 10^5$
CHIANTLA	$5.000 \times 10^5$
CHINIQUE	0.000000

Nota: Se efectuaron un quinto y sexto conteo en las fechas 6 y 26 de octubre de 1987, mas los resultados en ambas no fue necesario analizarlos debido a las escasa manifestación de población de rizobios.

\* Medias que mostraron ser significativamente diferentes, al 5% de significancia.

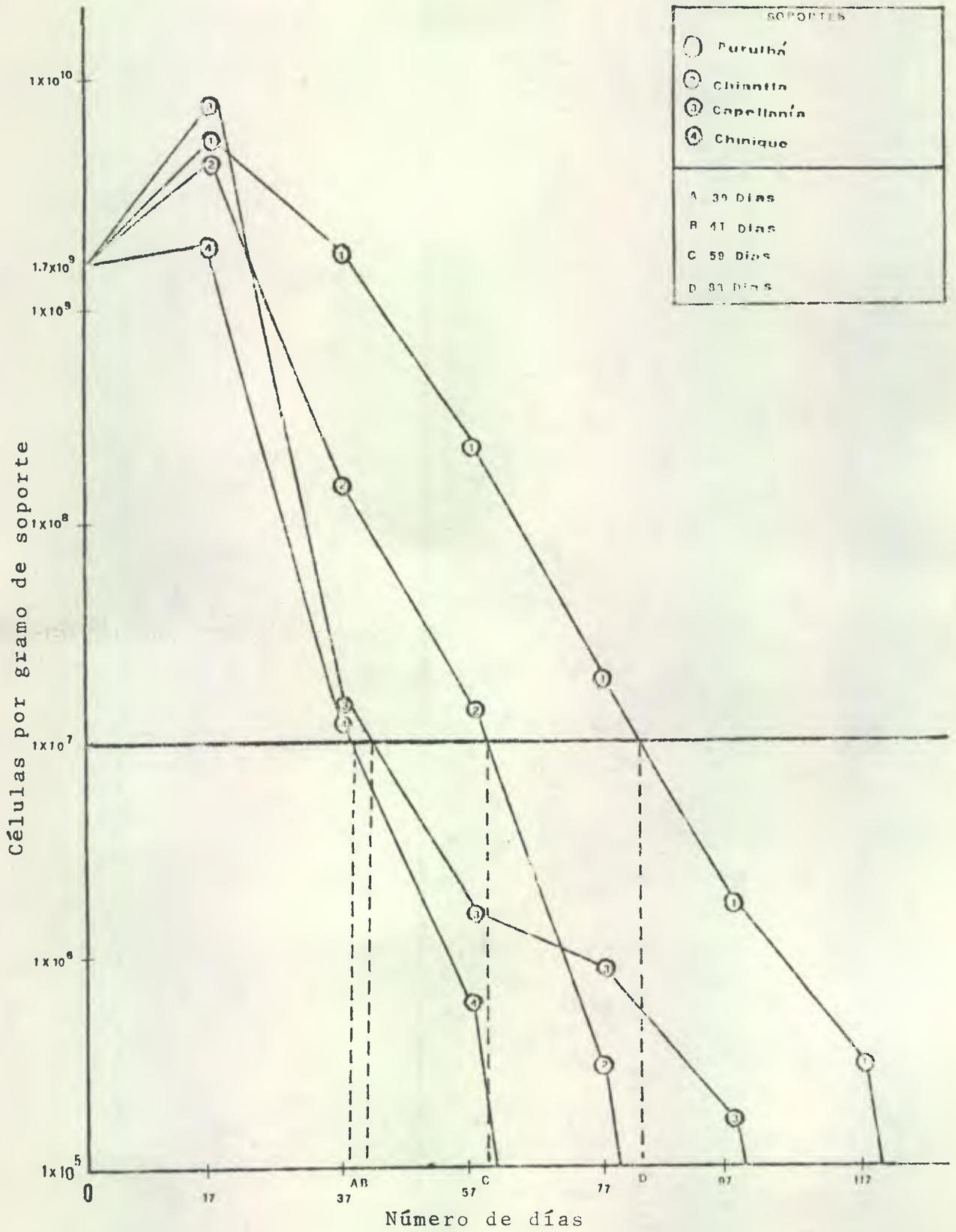


Figura 2. Comportamiento gráfico de los soportes con relación Población - Tiempo.

## VII. CONCLUSIONES

- 7.1 Los soportes con mayor contenido de materia orgánica y mayor capacidad de retención de humedad resultan ser más eficaces en mantener poblaciones altas de rizobios por mayor tiempo.
- 7.2 La turba Purulhá permite una sobrevivencia de 83 días al Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli a una temperatura de 26° C.
- 7.3 La hipótesis planteada no se cumple en su cabalidad, ya que los soportes Chinique, Capellanía y Chiantla no mantuvieron más de dos meses de población arriba de  $1 \times 10^7$  células/gramo de soporte.

## VIII. RECOMENDACIONES

Para la evaluación de sobrevivencia de Rhizobium se recomienda utilizar soportes con alto contenido de materia orgánica, específicamente con procedencias de turberas.

Para estudios posteriores se recomienda emplear la turba Purulhá, así como evaluar ésta en condiciones de almacenaje de temperaturas bajas (4°C) para poder dar una recomendación de manejo en óptimas condiciones de almacenaje y conocer el máximo potencial de sobrevivencia del Rhizobium en estas condiciones

Si se usa la turba Purulhá como soporte se recomienda no guardar los inoculares por más de 83 días cuando estos se manejan a temperatura ambiente.

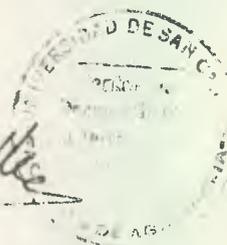
## IX. BIBLIOGRAFIA

1. AGUILERA MEJIA, R.G. 1973. Elaboración de problemas que se pueden presentar e la obtención de turbas inoculadas con Rhizobium. Palmira, Col., CIAT, Departamento de Micobiología de Suelos. 18 p.
2. BALATTI, A.P. s.f. Producción de inoculantes. La Plata, Arg., Centro de Investigaciones y Desarrollo de Fermentaciones Industriales. p. 47, 115.
3. \_\_\_\_\_.; MAZZA, L.A. s.f. Obtención de inoculantes para soja; comportamiento de soportes en base a turbas de Tierra de Fuego esterilizadas a vapor y óxido de etileno. La Plata, Arg., Universidad Nacional de La Plata. s.p.
4. BARRIENTOS GARCIA, M. 1982. Experimentos factoriales. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 11 p.
5. BOOGES, A.; CHAER, A. Algunos principios básicos de bacteriología.  
  
Sin Publicar.
6. COCHRAN, W.; COX, G. 1975. Diseños experimentales. México, Trillas. 661 p.
7. HAMDI, Y.A.; TUSCHEL, A.P. 1980. Legume inoculant production and major problems. In Reunión-Taller Latinoamericana sobre el Reciclaje de Materias Orgánicas en la Agricultura (1., 1980, San José, C.R.). Informe. Roma, FAO. p. 45-55.
8. LABANDERA, C. 1986. Producción y uso de inoculantes para leguminosas. In Reuniao Latinoamericana sobre Rhizobium (12., 1986, Bra.). Anais. Brazil, Secretaría de Estado Dos Negocios da Agricultura e Abastecimento. p. 15-16.
9. LOPRETO, C.R.; MAZZA, L.A.; BALATTI, A. 1975. Producción de inoculantes para soja. La Plata, Arg., Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Agronomía. p. 35-41.
10. MICROBIOLOGICAL RESOURCES CENTER (BRA.) 1980. Morfología e bioquímica do Rhizobium. Rio Grande do Sul, Bra., MIRCEN. Rhizobium MIRCEN Informativo no. 4. p. 23.
11. REYES CASTAÑEDA, P. 1981. Diseño de experimentos aplicados. 2 ed. México, Trillas. 332 p.

.../

12. SIMMONS, Ch.S.; TARANO, J.M.; PINTO, J.H. 1959. Clasificación de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala. Trad. por Pedro Tirado Sulsona. Guatemala, José de Pineda Ibarra. 1,000 p.
13. TAROUCO P., M.H. Controle de inoculantes; métodos usados para estimar a riqueza dos inoculantes para leguminosas.  
  
Sin Publicar.
14. TISDALE, S.; NELSON, W. 1982. Fertilidad de los suelos y fertilizantes. Trad. por Jorge Balasch y Carmen Piña. México, Uthea. 760 p.
15. VADES, M. 1986. Factores del suelos limitantes de la fijación biológica de nitrógeno. In Reuniao Latinoamericana sobre Rhizobium (12., 1986. Bra.). Anais. Brazil, Secretaria de Estado Dos Negocios da Agricultura e Abastecimento. p. 557.
16. VINCENT, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Buenos Aires, Argentina, Hemisferio Sur. 200 p.

Vo.Bo.

*Patruarte*

X. A P E N D I C E

Cuadro 1 Ejemplo de un esquema de dilución en que se esperan a proximadamente  $1 \times 10^9$  rizobios viables por gramo de soporte.

OPERACION			DILUCION OBTENIDA
- Tomar 1 gr. de turba y colocarlo en el frasco ( 1 ) agitar el frasco ( 1 )	(1)	99	$10^2$
- Usar pipeta (1) para tomar 1 cc. del frasco (1) y pasarlo al frasco (2) agitar el frasco (2)	(2)	99	$10^4$
- Usar pipeta (2) para tomar 1 cc. del frasco (2) a (3) agitar frasco (3)	(3)	9	$10^5$
- Usar pipeta (3) para tomar 1 cc. de (3) a frasco (4) Usar pipeta (4) para mezclar Retener la pipeta 95) para tomar 0.02 cc. de (4) a frasco (5)	94)	9	$10^6$
- Usar pipeta (6) para mezcla el contenido del frasco (5) y tomar alícuotas de $10^8$ para las cajas de Petri	95)	9	$10^7$

EJEMPLO: Las series de diluciones del cuadro anterior corresponden a una suspensión de la que se espera que contenga  $1 \times 10^9$  rizobios viables por gramo. (otras proporciones podrían requerir esquemas diferentes.)

## Cuadro 2 Medio BYMA (Brockwell Yeast Mannitol Agar)

Los materiales empleados y el procedimiento de la preparación es el siguiente:

$K_2HPO_4$	10 grs./100 ml. $H_2O$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4 grs./100 ml. $H_2O$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 grs./100 ml. $H_2O$
NaCl	4 grs./100 ml. $H_2O$
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	1 grs./100 ml. $H_2O$

## Preparación del extracto de levadura.

Tomar 600 gramos de levadura, suspenderlos en 5400 ml, de agua corriente durante una hora, al haberse sedimentado; se se para en papel filtro. Se embotella en cantidades de 100 ml. aproximadamente y se esteriliza en el autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

## Para preparar el medio.

Manitol	10 grs.
Solución PQR	5 ml. de c/u
Solución D	1 ml.
Extracto de levadura	100 ml.
Agar	20 grs.
Agua destilada	880 ml.
Azul de bromotimol	5 ml.

El pH debe estar comprendido entre 6.8 y 7

Para preparar suspenda el agar en 500 ml. de agua y las so luciones deberán autoclavarse por 10 minutos. Agregue los in- gredientes necesarios para ajustar el pH al rango requerido. Finalmente se esteriliza a 15 psi durante 15 minutos.

Cuadro 3 Datos de la calibración de micropipetas para obtener el número de gotas contenidas en un volumen de 2 centímetros cúbicos y su correspondiente factor de corrección

Numero de Micropipeta	Promedio del Numero de gotas	Factor * de correccion	Numero de Micropipeta	Promedio del Numero de gotas	Factor* de correccion
1	58	0.0345	26	60	0.0333
2	70	0.0286	27	68	0.0294
3	64	0.0313	28	59	0.0339
4	63	0.0317	29	66	0.0303
5	62	0.0323	30	60	0.0333
6	62	0.0323	31	59	0.0339
7	63	0.0317	32	62	0.0323
8	65	0.0308	33	58	0.0345
9	66	0.0303	34	59	0.0339
10	67	0.0299	35	60	0.0333
11	63	0.0317	36	53	0.0377
12	63	0.0317	37	69	0.0289
13	61	0.0328	38	60	0.0333
14	64	0.0313	39	61	0.0328
15	59	0.0339	40	63	0.0337
16	64	0.0313	41	57	0.0351
17	57	0.0351	42	65	0.0308
18	58	0.0345	43	57	0.0351
19	61	0.0328	44	70	0.0286
20	60	0.0333	45	65	0.0308
21	62	0.0323	46	66	0.0303
22	60	0.0333	47	62	0.0323
23	63	0.0317	48	63	0.0317
24	62	0.0323	49	64	0.0313
25	59	0.0339	50	60	0.0333

\* Se obtiene de dividir el volumen (2.cc.) entre el número de gotas promedio de cada micropipeta.

Cuadro 4 Datos de variación de valores de pH para los diferentes soportes, utilizando diferentes niveles de aplicación de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como neutralizador.

Turba Purulhá		Suelo Capellanía	
Grs. de $\text{CaCO}_3$	pH	Grs. de $\text{CaCO}_3$	pH
0.00	5.50	0.00	58.5
0.01	5.70	0.01	5.85
0.03	5.70	0.03	5.90
0.05	5.75	0.05	6.00
0.07	5.85	0.07	6.05
0.10	5.95	0.10	6.20
0.12	6.15	0.12	6.15
0.15	6.25	0.15	6.25
0.17	6.35	0.17	6.40
0.20	6.40	0.20	6.50
0.22	6.45	0.22	6.55
0.25	6.50	0.25	6.60
0.27	6.60	0.27	6.70
0.30	6.85	0.30	6.85
0.35	6.90	0.37	7.15
0.37	6.95		
0.40	7.05		
Suelo Chiantla		Suelo Chinique	
Grs. de $\text{CaCO}_3$	pH	Grs. de $\text{CaCO}_3$	pH
0.00	6.40	0.00	6.20
0.01	6.45	0.01	6.35
0.03	6.45	0.03	6.50
0.05	6.50	0.05	6.55
0.07	6.60	0.07	6.60
0.10	6.65	0.10	6.60
0.12	6.75	0.12	6.60
0.15	6.85	0.15	6.65
0.17	6.95	0.17	6.80
0.20	7.05	0.20	6.85
		0.22	6.95

Cuadro 5 Resultado del número de colonias obtenidas de las cajas de petri en la primera lectura de fecha 16/07/87,

SOPORTE	RE PE TI CION	$1 \times 10^5$					$1 \times 10^6$					$1 \times 10^7$					$1 \times 10^8$				
		CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE				
		1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$
PURULHA	I	*	*	*	*	122	103	109	-	113.00	-	7	9	-	8	4	3	6	0	3.25	
	II	*	*	*	*	98	-	105	111	104.67	-	16	27	15	19.30	5	4	4	5	4	
	III	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	7	3	3.25	
CAPELLA- NIA	I	*	*	*	*	-	-	-	-	-	26	23	22	20	22.75	2	4	2	0	2	
	II	*	*	*	*	118	94	114	135	115.25	22	23	20	-	21.67	8	4	9	4	6.25	
	III	*	*	*	*	-	96	107	91	98	27	25	21	22	23.75	8	4	5	7	6	
CHIANTLA	I	*	*	*	*	-	-	-	-	-	20	26	-	-	23	2	3	2	2	2.25	
	II	*	*	*	*	-	33	-	-	33	9	11	9	-	9.33	1	1	2	4	2	
	III	*	*	*	*	162	184	122	156	156	9	7	8	-	8	3	5	8	5	5.25	
CHINIQUE	I	*	*	*	*	-	14	43	-	28.5	28	9	5	3	11.25	0	0	0	2	0.5	
	II	*	*	*	*	65	56	85	63	67.25	9	8	8	13	9.5	2	2	2	0	1.5	
	III	*	*	*	*	71	74	57	54	64	14	1	6	8	7.25	-	2	1	1	1	

\* = No se pudieron contar debido a lo confluyente de las colonias

- = Crecimiento irregular de las colonias

0 = No se presentaron colonias.

Cuadro 6 Resultado del conteo de rizobios de la primera lectura expresado en número de células por cc. de dilución

SO- POR TE	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
P U R U L H A	*	$3.955 \times 10^9$	$2.440 \times 10^9$	$9.588 \times 10^9$
	*	$3.663 \times 10^9$	$5.887 \times 10^9$	$11.80 \times 10^9$
	*	-	-	$9.588 \times 10^9$
C A P E L L A N I A	*	-	$7.394 \times 10^9$	$6.300 \times 10^9$
	*	$3.853 \times 10^9$	$7.035 \times 10^9$	$19.72 \times 10^9$
	*	$3.283 \times 10^9$	$7.711 \times 10^9$	$18.93 \times 10^9$
C H I A N T L A	*	-	$7.012 \times 10^9$	$7.096 \times 10^9$
	*	$1.022 \times 10^9$	$2.844 \times 10^9$	$6.309 \times 10^9$
	*	$4.829 \times 10^9$	$2.439 \times 10^9$	$16.56 \times 10^9$
C H I N I Q U E	*	$0.941 \times 10^9$	$3.378 \times 10^9$	$1.475 \times 10^9$
	*	$2.219 \times 10^9$	$2.852 \times 10^9$	$4.425 \times 10^9$
	*	$2.112 \times 10^9$	$2.177 \times 10^9$	$2.949 \times 10^9$

\* = No se pudieron contar debido a lo confluyente de las colonias

- = Crecimiento irregular de las colonias.

Cuadro 7 Resultado del número de colonias obtenidas de las cajas de petri en la segunda lectura de fecha 05/08/87

SOPORTE	RE PE TI CION	$1 \times 10^5$					$1 \times 10^6$					$1 \times 10^7$					$1 \times 10^8$				
		CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE				
		1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$
PURULHA	I	*	*	*	*		46	47	57	51	50.25	6	7	2	8	5.75	0	1	0	3	1
	II	*	*	*	*		55	64	51	55	56.25	6	9	3	6	6	1	2	0	2	1.25
	III	*	*	*	*		-	-	-	-	-	6	7	9	10	8	1	0	0	1	0.25
CAPELLANIA	I	7	4	3	6	5	0	0	1	0	0.25	1	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0
	II	1	2	2	5	2.50	0	2	0	0	0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	2	6	5	6	4.75	2	0	0	1	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHIANTLA	I	7	10	9	6	8	2	3	5	3	3.25	0	0	0	1	0.25	0	0	0	0	0
	II	4	12	12	7	8.75	1	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.25
	III	6	7	8	5	6.50	2	6	2	2	3	1	1	0	1	0.75	0	0	0	0	0
CHINIQUE	I	7	5	3	6	5.25	0	0	1	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	1	2	2	5	2.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	2	6	5	6	4.75	1	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- \* = No se pudieron contar debido a lo confluyente de las colonias
- = Crecimiento irregular de las colonias
- 0 = No se presentaron colonias.

Cuadro 8 Resultado del conteo de rizobios de la segunda lectura expresado en número de células por cc. de dilución.

SO- POR TE	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
P U R U L H A	*	$1.510 \times 10^9$	$1.870 \times 10^9$	$3.000 \times 10^9$
	*	$1.690 \times 10^9$	$1.950 \times 10^9$	$3.750 \times 10^9$
	*	-	$2.600 \times 10^9$	$0.750 \times 10^9$
C A P E L L A N I A	$0.016 \times 10^9$	$0.072 \times 10^9$	$0.026 \times 10^9$	0.000000
	$0.028 \times 10^9$	$0.015 \times 10^9$	0.000000	0.000000
	$0.016 \times 10^9$	$0.022 \times 10^9$	0.000000	0.000000
C H I A N T L A	$0.025 \times 10^9$	$0.089 \times 10^9$	$0.076 \times 10^9$	0.000000
	$0.027 \times 10^9$	$0.059 \times 10^9$	$0.788 \times 10^9$	0.000000
	$0.021 \times 10^9$	$0.089 \times 10^9$	$0.239 \times 10^9$	$0.239 \times 10^9$
C H I N I Q U E	$0.016 \times 10^9$	$0.009 \times 10^9$	0.000000	0.000000
	$0.008 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000
	$0.015 \times 10^9$	$0.009 \times 10^9$	0.000000	0.000000

\* = No se pudieron contar debido a lo confluyente de las colonias

- = Crecimiento irregular de las colonias

Cuadro 9 Resultado del número de colonias obtenidas de las cajas de petro en la cuarta lectura de fecha 26/08/87

SOPORTE	RE PE TI CION	$1 \times 10^5$					$1 \times 10^6$					$1 \times 10^7$					$1 \times 10^8$				
		CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE				
		1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$
PURULHA	I	70	58	60	76	66	7	8	14	19	12	1	2	2	1	1.5	0	1	0	0	0.25
	II	79	71	70	45	66.25	22	16	-	-	19	1	0	0	1	0.5	0	0	0	0	0
	III	74	81	65	80	75	-	22	21	4	15.67	0	1	0	0	0.25	0	0	0	0	0
CAPELLINA	I	1	0	0	4	1.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	2	0	0	0	0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	1	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GHIANTLA	I	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	4	8	0	3	0	1	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHINIQUE	I	0	0	1	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	1	0	0	0	0.25	1	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	1	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 10 Resultado del conteo de rizobios en la tercera lectura expresado en número de células por cc. de dilución.

SO- POR TE	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
P U R U L H A	$0.210 \times 10^9$	$0.380 \times 10^9$	$0.500 \times 10^9$	$0.740 \times 10^9$
	$0.210 \times 10^9$	$0.600 \times 10^9$	$0.170 \times 10^9$	0.000000
	$0.240 \times 10^9$	$0.500 \times 10^9$	$0.084 \times 10^9$	0.000000
C A P E L L A N I A	$0.004 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000
	$0.002 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000
	$0.078 \times 10^7$	0.000000	0.000000	0.000000
C H I A N T L A	$0.003 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	$0.009 \times 10^9$	$0.074 \times 10^9$	0.000000	0.000000
C H I N I Q U E	$0.008 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000
	$0.008 \times 10^9$	$0.008 \times 10^9$	0.000000	0.000000
	$0.008 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000

Cuadro 11 Resultado de número de colonias obtenidas de las cajas de petri en la cuarta lectura de fecha 16/09/87

SOPORTE	RE PE TI CION	$1 \times 10^5$					$1 \times 10^6$					$1 \times 10^7$					$1 \times 10^8$				
		CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE				
		1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$
PURUHA	I	25	12	17	16	17.5	0	1	3	2	2	1	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0
	II	12	13	12	13	12.5	0	0	0	1	0.25	0	1	0	0	0.25	0	0	0	0	0
	III	8	13	12	13	11.5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.25	0	0	0	0	0
CAPELLINA	I	0	0	0	3	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHIANTLA	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	2	0	0	0	0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHINIQUE	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 12 Resultado del conteo de rizobios de la cuarta lectura expresado en número de células por cc. de dilución

SO- POR- TE	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
P U R U L H A	$0.058 \times 10^9$	$0.062 \times 10^9$	$0.008 \times 10^9$	0.000000
	$0.041 \times 10^9$	$0.008 \times 10^9$	$0.008 \times 10^9$	0.000000
	$0.038 \times 10^9$	$0.008 \times 10^9$	0.000000	0.000000
C A P E L L A N I A	$0.002 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
C H I A N T L A	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	$0.015 \times 10^8$	0.000000	0.000000	0.000000
C H I N I Q U E	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Cuadro 13 Resultado del número de colonias obtenidas de las cajas de petri en la quinta lectura de fecha 06/10/87

SOPORTE	RE PE TI CION	$1 \times 10^5$					$1 \times 10^6$					$1 \times 10^7$					$1 \times 10^8$				
		Cuadrante					Cuadrante					Cuadrante					Cuadrante				
		1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$	1	2	3	4	$\bar{X}$
PURULHA	I	0	0	1	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	1	0	0	0	0.25	0	1	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAPELLANIA	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	1	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHIANTLA	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHINIQUE	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Cuadro 14 Resultado del conteo de rizobios de la quinta lectura expresado en número de células por cc. de dilución

SOPORTE	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
PURULLHA	$0.008 \times 10^8$	0.000000	0.000000	0.000000
	$0.008 \times 10^8$	$0.077 \times 10^9$	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
CAPELLANIA	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	$7.600 \times 10^9$	0.000000	0.000000	0.000000
CHIANTLA	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
CHINIQUE	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Cuadro 15 Resultado del número de colonias obtenidas de las cajas de petri en la sexta lectura de fecha 26/10/87

SOPORTE	REPETICION	$1 \times 10^5$					$1 \times 10^6$					$1 \times 10^7$					$1 \times 10^8$				
		CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE					CUADRANTE				
		1	2	3	4	X	1	2	3	4	X	1	2	3	4	X	1	2	3	4	X
PURULHA	I	0	1	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	1	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAPELLANIA	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHIANTLA	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHINIQUE	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 16 Resultado del conteo de rizobios de la sexta lectura expresado en número de células por cc. de dilución.

SO- POR- TE	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
P U R U L H A	$7.900 \times 10^5$	0.000000	0.000000	0.000000
	$7.900 \times 10^5$	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
C A P E L L A N I A	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
C H I A N T L A	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
C H I N E Q U E	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000



FACULTAD DE AGRONOMIA  
GUATEMALA, C. A.

15 - V - 1959

"IMPRESA"



*[Handwritten signature]*  
ING. AGR. ANIBAL B. MARTINEZ M.  
DECANO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central