

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS de *Rhizobium*  
*leguminosarum* biovar *phaseoli*, DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*)  
CULTIVADO EN LOS DEPARTAMENTOS DE JUTIAPA Y  
CHIMALTENANGO**

**CLAUDIA LORENA CARRANZA MELÉNDEZ**

**QUÍMICA BIOLOGA**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE DEL 2004**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS de *Rhizobium*  
*leguminosarum* biovar *phaseoli*, DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*)  
CULTIVADO EN LOS DEPARTAMENTOS DE JUTIAPA Y  
CHIMALTENANGO**

Informe de Tesis

Presentado por:

Claudia Lorena Carranza Meléndez

Previo a optar al título de:

Química Biológica

Guatemala, Noviembre del 2004

**JUNTA DIRECTIVA****FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

M.Sc.	Gerardo Leonel Arroyo Catalán	<b>Decano</b>
Licda.	Jannette Sandoval Madrid de Cardona	<b>Secretaria</b>
Licda.	Gloria Elizabeth Navas Escobedo	<b>Vocal I</b>
Licda.	Liliana Vides de Urizar	<b>Vocal II</b>
Licda.	Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	<b>Vocal III</b>
Br.	Roberto José Garnica Marroquín	<b>Vocal IV</b>
Br.	Rodrigo José Vargas Rosales	<b>Vocal V</b>



## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por permitirme ser un eslabón en esa gran cadena que conformamos, y que nos brinda la fortaleza para alcanzar nuestro fin.

A mi prima Marjorie, por ser como una hermana más y mostrarme su apoyo a lo largo de mi vida.

A mis amigas, por demostrarme el verdadero significado de la amistad ayudándome a recorrer mi camino.

A mis alumnos, por ayudarme a descubrir la experiencia de enseñar y principalmente por haberme brindado su amistad.

A cada persona, que sabe que de alguna manera ha sido pieza clave en el desarrollo de mi existencia; sirviendo de roca firme para apoyarse en todo momento.

Al Ingeniero Juan José Soto, por permitirme realizar este proyecto de Investigación.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola, por permitirme participar en su proyecto de investigación.

Al Ingeniero Rolando Aguilera y Licenciada Karin Herrera por su asesoría en el desarrollo de esta tesis.

Al Laboratorio de Análisis Microbiológico de Referencia, por brindarme apoyo para la realización de la tesis.

A la Licda. Amanda Gálvez y Licda. Maria Luisa de López, por ser revisoras de la tesis.

## ÍNDICE

		Página
I.	Resumen .....	08
II.	Introducción .....	10
III.	Antecedentes .....	12
	A. <i>Rhizobium</i> sp. ....	12
	1. Generalidades y taxonomía .....	12
	2. Fisiología .....	13
	3. Morfología y características .....	15
	B. Influencia del ambiente sobre la fijación de Nitrógeno .....	16
	C. Estudios realizados en Guatemala .....	18
IV.	Justificación .....	20
V.	Objetivos .....	21
VI.	Materiales y Métodos .....	22
VII.	Resultados .....	31
VIII.	Discusión de resultados .....	37
IX.	Conclusiones .....	42
X.	Recomendaciones .....	43
XI.	Referencias .....	44
XII.	Anexos .....	48

## I. RESUMEN

Esta investigación se realizó con el objetivo de aislar e identificar cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* de plantas de frijol común cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango. La importancia del mismo radica en la posibilidad de que estas cepas puedan ser estudiadas en futuros ensayos, con el fin establecer su potencial de fijación biológica de nitrógeno.

La metodología utilizada fue la sugerida por Vincent y Somasegaran, que consistió en dos fases. La primera fase fue el aislamiento de cepas a partir de nódulos y purificación de las mismas; además se realizaron pruebas preliminares como producción de ácido, reacción de Gram y movilidad, que permitieron identificar presuntamente las cepas como *Rhizobium*. La segunda fase consistió en la identificación de las cepas sospechosas de *Rhizobium*, mediante la infección in-vivo de plantas de frijol común, realizando para ello una serie de diluciones desde 1:5 hasta 1:3125 y cuatro repeticiones por cada dilución.

Se recolectaron un total de 68 muestras de nódulos, de las cuales se aislaron 40 cepas sospechosas de *Rhizobium*. Las 40 cepas se identificaron por infección in-vivo en la variedad ICTA-HUNAPU de *Phaseolus vulgaris* y se obtuvieron 23 cepas infectivas. Estas 23 cepas tienen alta probabilidad de ser *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.

Las cepas pertenecientes a Aldea La Unión, Santa Catarina Mita; El Retiro II, Quezada; La Barranca, Santa Catarina Mita y El Ovejero I, El Progreso presentaron alta infectividad.

Del análisis de suelo realizado se observó que la variabilidad del pH no afectó la simbiosis de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y el frijol. Otro aspecto importante es que la mayoría de nódulos grandes (3-4 mm. diámetro) se obtuvieron de suelos con textura franco arcillo arenosa.

Se recomienda evaluar las 23 cepas aisladas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, con el fin de establecer su potencial como fijadoras de nitrógeno en las distintas variedades comerciales de frijol.

## II. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es uno de los macronutrientes esenciales para el buen desarrollo de plantas. Este elemento es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. Las bacterias del género *Rhizobium* poseen la capacidad de fijar el nitrógeno, mediante una relación de simbiosis con leguminosas.

Desde hace algún tiempo el interés por estudiar *Rhizobium* ha ido aumentando, pues existe la posibilidad de utilizarlo como bio-fertilizante. Además se conoce que el uso de fertilizantes químicos nitrogenados ha ocasionado un aumento de la contaminación ambiental, pues el fertilizante no utilizado por la planta acaba en lagos o lagunas.

En Guatemala la leguminosa de mayor consumo es el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), el cual suministra entre el 20% y 30% del consumo total de proteína. Debido a la importancia del frijol en Guatemala, se han realizado una gran variedad de estudios sobre aislamiento, evaluación de cepas nativas y extranjeras, así como ensayos de cultivo a gran escala de *Rhizobium*.

Actualmente, no existen en Guatemala cepas nativas fijadoras de nitrógeno que estén a disposición de los agricultores, pues las cepas obtenidas a partir de los estudios anteriores, se encuentran en centros de recursos microbiológicos en otros países.

En el presente trabajo se realizó con el fin de aislar e identificar cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* de plantas de frijol en los departamentos de

Jutiapa y Chimaltenango; lo que permitirá realizar estudios posteriores sobre fijación de nitrógeno y a su vez la selección de las cepas más eficaces.

### III. ANTECEDENTES

#### A. *Rhizobium sp.*

##### 1. Generalidades y taxonomía

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. El grupo de bacterias que pertenecen al género *Rhizobium*, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio (1, 3, 4).

Beijerinck en 1888, obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de raíz de leguminosa y lo llamó *Bacillus radicicola*. Posteriormente, Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados. Basada en la especificidad de los huéspedes para 1929 ya se habían reconocido seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. En esta clasificación, cada especie se componía de cepas que compartían un grupo de leguminosas huésped. En 1944 Wilson reportó un gran número de nodulaciones que cruzaban las fronteras de las diferentes especies clasificadas anteriormente. En 1964 Graham y en 1968 Moffett y Golwell sugirieron revisar la taxonomía basándose en resultados de la taxonomía numérica (1).

Más tarde, en 1974, Jordan y Allen dividieron estas especies en dos grupos de acuerdo con sus tasas de crecimiento, flagelos y reacciones ácido/alcalinas en medio manitol levadura, estos grupos son los siguientes:

- Grupo I: de crecimiento rápido, productoras de ácido, con dos a seis flagelos, las colonias miden de 2-4 mm. a los 3-5 días de incubación en agar manitol levadura, y son aislados de leguminosas de regiones templadas. A este grupo pertenecen *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *R. trifolii*, *R. meliloti* (Anexo 1).
- Grupo II: de crecimiento lento, productores de bases, con flagelos. Las colonias miden 1 mm. a los 5-7 días de incubación en agar manitol levadura, y son aislados de leguminosas tropicales. Aquí se encuentra *R. japonicum* y *R. lupini* (1,5-8).

La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. Las técnicas que se utilizan para la clasificación de rizobios son el análisis de secuencias de los genes 16S rRNA, y la hibridación de ADN-ADN. Hasta la fecha se han propuesto 6 géneros, que son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (1).

## **2. Fisiología.**

### **Proceso de nodulación**

La nodulación consta de varias etapas, que describen a continuación:

- Reconocimiento de la combinación adecuada de organismos: En este paso la planta secreta a la rizósfera ciertos compuestos que sirven de señal y como mediadores de la especificidad de las leguminosas. Estos compuestos pueden ser

derivados del ácido araquidónico ó flavonoides, siendo estos últimos los más estudiados. En respuesta a estos compuestos los rizobios activan una serie de genes implicados en la nodulación; los cuales se conocen como genes NOD que producen los factores NOD, estos factores son glucosaminas con un ácido araquidónico en la parte no reductora del azúcar. Los factores NOD inducen la deformación del pelo radical en la mayoría de leguminosas (1,3,4,9-11).

- Encurvamiento del pelo radical: Para que la nodulación ocurra son necesarios los factores NOD y los flavonoides. Los factores NOD inducen un flujo de iones Calcio (  $Ca^{+2}$  ) que provocan la despolarización de la membrana y como consecuencia un rearrreglo de los filamentos de actina, cambiando así la dirección de los pelos radicales (1,3,4,9-11).

- Generación del hilo de infección: En este paso participan los compuestos conocidos como lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos y cumplen la función de adherencia entre la bacteria y la planta. Entonces la bacteria penetra en el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal de infección (1,3,4,9-11).

- Formación de vesículas: esta es inducida por los factores NOD por parte de *Rhizobium* y por fitohormonas como la auxina que funcionan como mensajeros para sensibilizar las células vegetales. Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis. Los rizobios quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedera y que se llama la membrana peribacteroidal (MPB).

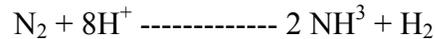
Luego ocurren una serie de divisiones hasta obtener los bacteroides que son vesículas de la MPB proporcionada por la planta hospedera que encubren las bacterias. Estos bacteroides pueden llegar a ser hasta cuarenta veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Los bacteroides inician el proceso de fijación de nitrógeno (1,3,4,9-11).

- Forma externa de los nódulos: La forma es determinada principalmente por la planta hospedera, puede ser esférico, cilíndrico o circular. Los nódulos que se encuentran activos son de mayor tamaño y presentan una coloración rojiza, que se atribuye a la presencia de la proteína leg-hemoglobina. Esta proteína se ha estudiado ampliamente, por su relación con la simbiosis. Actualmente se conoce que el grupo hemo proviene de los bacteroides y la globina de la planta, su principal función consiste en facilitar la difusión del oxígeno dentro del nódulo; que es útil como transportador de electrones dentro de la fijación de nitrógeno (11,12).

### **Fijación de nitrógeno:**

Este proceso se define bioquímicamente como la reducción de nitrógeno atmosférico a amoníaco. En este proceso interviene el complejo enzimático nitrogenasa; que consiste en dos componentes proteínicos, una proteína con hierro y otra con hierro y molibdeno. Consiste en una reacción neta de oxidoreducción en la cual el nitrógeno atmosférico es reducido a amoníaco y la ferredoxina reducida es oxidada. Esta reacción depende de un ciclo de reducciones y oxidaciones que realiza internamente el complejo nitrogenasa, utilizando 2 ATP y dos iones magnesio como catalíticos (1,6,13).

La reacción del nitrógeno es la siguiente:



## **2. Morfología y características de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.**

Son bacilos aeróbicos, no esporoformadores, Gram. negativo que miden 0.5-1.0x1.2-3.0  $\mu\text{m}$ . Poseen de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Cuando las células bacterianas son viejas presentan alta cantidad de gránulos de beta-hidroxibutirato. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos (1,5,9-12).

*Rhizobium* crece bien en medios de cultivo que contengan una fuente de carbono como manitol o glucosa, amonio o nitrato y otras sales inorgánicas. Uno de los medios más utilizados es el agar manitol-levadura (YMA); en el cual las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en YMA . El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de gelatina de polisacáridos extracelular (Anexo 2) (5,9-12).

## **B. INFLUENCIA DEL AMBIENTE SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO**

Existen una gran diversidad de factores ambientales que influyen directamente en la eficacia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, en la fijación de nitrógeno, entre ellos se pueden mencionar los siguientes:

- Nitrógeno inorgánico: La presencia de nitrógeno inorgánico en el suelo, procedente de fertilizantes inhibe la fijación de nitrógeno. El tamaño de los nódulos y su cantidad es menor cuanto existen niveles relativamente altos de nitrato y amonio. Por otro lado bajas concentraciones de nitrógeno inorgánico estimula la nodulación (11).
  
- pH del Suelo: En la mayoría de leguminosas la infección de *Rhizobium* no ocurre en pH menores a 5. El crecimiento de *Rhizobium* también se ve influenciado por pH bajos. Esta inhibición de la simbiosis en suelos ácidos, se debe a la concentración de iones hidronio, a la toxicidad resultante del hierro y aluminio principalmente (10,11).
  
- Temperatura: la temperatura óptima de crecimiento de *Rhizobium* es de 30 grados Celsius (12).
  
- Fósforo y potasio: son macronutrientes esenciales para el crecimiento de la planta, por lo que su presencia en el suelo se asocia con leguminosas vigorosas y de buen crecimiento (14).
  
- Micronutrientes: El cobalto estimula marcadamente la utilización de nitrógeno atmosférico por las leguminosas, se cree que esto se debe a que estimula la proliferación y metabolismo de *Rhizobium* dentro de la raíz. Los micronutrientes son necesarios tanto para la leguminosa como para *Rhizobium*, y por ende para una simbiosis efectiva (11,12).

### C. ESTUDIOS REALIZADOS EN GUATEMALA

En Guatemala, el primer estudio sobre *Rhizobium* fue realizado en 1974 por Aguilera, el cual consistió en la evaluación de 14 cepas de *Rhizobium phaseoli* en tres variedades de frijol común. De estas cepas evaluadas 8 fueron traídas del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y 6 fueron cepas nativas de la colección del ICTA; algunas de estas cepas nativas resultaron ser efectivas para las variedades de frijol estudiadas, en cambio algunas cepas del extranjero no fueron efectivas, se piensa que se debe a las condiciones ambientales diferentes (2).

En 1980, Pellecer evaluó la eficiencia relativa que se produce en el rendimiento de grano, al inocular dos variedades de frijol común con cepas mixtas nativas comparadas con una cepa estándar como control. Este es uno de los primeros estudios de evaluación de nitrógeno reportados en Guatemala. Se obtuvieron muestras de plantas de Jutiapa y Párramos, se esterilizaron nódulos, a partir de ellos se prepararon suspensiones para inocular en los terrenos de frijol. Las cepas mixtas nativas mostraron ser eficientes, resaltando aquella proveniente del suelo de condiciones más pobres (Párramos), sin embargo no superaron a la cepa estándar CIAT 57. Es importante resaltar que en este estudio no se purificaron ni identificaron las cepas nativas, ya que la evaluación se realizó directamente de suspensiones de los nódulos recolectados (14).

En 1982, Méndez evaluó 9 cepas proporcionadas por el CIAT, de las cuales dos (CIAT 390, 407) resultaron ser las más eficientes para las variedades de frijol utilizadas (15).

En 1986, Campos realizó un nuevo estudio de aislamiento de *Rhizobium* de suelos de Guatemala, Chimaltenango, Santa Rosa y Sacatepequez. Se muestrearon un total de 28

suelos, lográndose aislar 26 cepas. Primero se realizó muestreo de suelos, posteriormente se sembró semillas de frijol en bolsas que contenían las muestras de suelo recolectadas, luego se evaluó la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno; y por último se procedió a aislar las cepas de los mejores nódulos obtenidos (16). Posteriormente en un estudio realizado por Miyares, se analizaron trece de las cepas nativas aisladas, su evaluación se realizó a nivel de invernadero en jarras de Leonard, seleccionándose 4 cepas efectivas para las variedades de frijol negro Quetzal y Jutiapan (17).

En 1988, Contreras evaluó en campo cuatro cepas de *Rhizobium* del CIAT, este estudio fue realizado en conjunto con la facultad de agronomía, el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) y el CIAT. Dos cepas son procedentes de Colombia y dos son nativas de Guatemala aisladas por Aguilera en 1980 (18).

Por último en 1990, Carrillo evaluó cuatro cepas procedentes del CIAT y las comparó con una cepa nativa; dicha cepa nativa presentó un rendimiento muy alto (19).

## IV. JUSTIFICACIÓN

Uno de los productos de mayor importancia económica y social para el país es el frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

El frijol común necesita de nitrógeno para crecer adecuadamente. Este presenta la ventaja de que forma una simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*; dicha simbiosis le permite obtener el nitrógeno del proceso de fijación biológica realizada por *Rhizobium*. El uso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como bio-fertilizante, se ha convertido en una opción natural para disminuir el uso de fertilizantes químicos.

Dentro del país, se han realizado estudios de aislamiento de cepas nativas, así como de evaluación de las mismas y de cepas procedentes del extranjero. Se ha visto que existe dificultad de trabajar con cepas del extranjero, pues las condiciones ambientales varían y además el costo económico es muy alto. Dentro de las cepas nativas que se han aislado, algunas resultaron ser muy efectivas para la fijación biológica de nitrógeno, sin embargo han sido enviadas a los centros internacionales de recursos microbiológicos de Brasil, Colombia y Hawaii. Por lo que actualmente no existen cepas nativas fijadoras de nitrógeno que estén a la disponibilidad de los agricultores. El presente estudio se utilizará como base para la creación de un cepario nacional de *Rhizobium*. La importancia de este estudio radica en la posibilidad de estudiar las cepas, y obtener las más eficaces en fijación de nitrógeno de manera que se facilite su utilización en Guatemala por los agricultores en general.

Además Guatemala como centro de origen del frijol es buen lugar para aislar y estudiar cepas de *Rhizobium*, por lo que se justifica la realización de más estudios de aislamiento para su posterior evaluación del potencial de nitrógeno.

## V. OBJETIVOS

- A.** Aislar cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango.
  
- B.** Identificar las cepas aisladas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* mediante la infección de *Phaseolus vulgaris*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO DE TRABAJO

Nódulos de *Phaseolus vulgaris* cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango.

### B. MUESTRA

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se recolectaron un total de 68 muestras de nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en los municipios de Santa Catarina Mita, Agua Blanca, Jutiapa, Quezada, Progreso, Comapa, Moyuta y Conguaco, pertenecientes al departamento de Jutiapa; y los municipios de San Martín Jilotepeque, Patzicia, Tecpán, Patzún y Santa Polonia, pertenecientes al departamento de Chimaltenango.

### C. RECURSOS HUMANOS:

- Asesores de Tesis: Ing. Agrónomo Rolando Aguilera Mejía y Licenciada Karin Herrera.
- Tesista: Bachiller Claudia Carranza Meléndez
- Ing. Agrónomo Juan José Soto.

### D. RECURSOS INSTITUCIONALES:

- Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola –ICTA-
- Laboratorio de Análisis Microbiológicos de Referencia –LAMIR- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

## **F. RECURSOS MATERIALES**

### **1. EQUIPO**

- Refrigerador
- Autoclave
- Campana de flujo laminar y luz ultravioleta
- Mechero
- Microscopio
- Balanza
- Estufa
- Asas de nicromo

### **2. CRISTALERÍA:**

- Vasos de precipitación.
- Matraces
- Probetas
- Pipetas serológicas
- 600 cajas de Petrie plásticas desechables
- 180 tubos de vidrio de rosca de 100 mm.\* 13 mm.
- 5 hojas para bisturí No. 3
- 100 bolsas plásticas 5 lbs.
- 10 lbs. algodón
- 500 portaobjetos
- 200 cubreobjetos

- 250 viales de vidrio para transporte de muestra
- 1500 bolsas de crecimiento de propileno especiales para *Rhizobium* (CIAT, 1987): bolsas de propileno estériles (16\*18cm), cada bolsa contiene una hoja de papel absorbente, doblada en la parte superior formando un canal en donde se coloca la semilla pregerminada.
- Semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), variedad ICTA-HUNAPU procedentes del ICTA.

### 3. REACTIVOS (ver preparación: Anexo No.3)

- Sílica gel.
- Colorantes para tinción de Gram.:
- Etanol al 95%.
- Hipoclorito de calcio al 3%.
- Medios de cultivo:

Caldo Manitol-levadura

Agar Manitol-Levadura:

- Colorante azul de bromotimol
- Solución nutritiva para planta

## G. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

- **Diseño del muestreo:** Se realizó un muestreo por conveniencia con una unidad muestral de 68 leguminosas *Phaseolus vulgaris* de los municipios de Jutiapa y Chimaltenango.
- **Unidad de observación:** Nódulos de cada una de las plantas recolectadas.
- **Tipo de estudio:** Es un descriptivo-exploratorio, prospectivo y transversal. El estudio constó de dos fases principales: El aislamiento de cepas de *Rhizobium* y la identificación del mismo.

## H. MÉTODOLÓGIA UTILIZADA

**1. INFORMACIÓN PREVIA DE LOS LUGARES DE MUESTREO:** La información recolectada de cada sitio de muestreo fue: Nombre de la aldea, variedad de frijol utilizada, si se fertilizó químicamente o no, el tamaño nodular y las características físicoquímicas del suelo.

### **2. RECOLECCIÓN DE NÓDULOS:**

- Los nódulos se recolectaron de plantas verdes y sanas.
- Se realizó un círculo de radio de 15 cm. alrededor de la planta y se cortó esta sección; de profundidad de 20 cm. o más.
- El suelo fue removido de la raíz con las manos.

- Luego se procedió a lavar cuidadosamente las raíces para obtener nódulos, dejando una pequeña porción de la raíz (0.5 cm.).
- Los nódulos se colocaron en viales de rosca con sílica gel en el fondo, seguido de un poco de algodón. Los nódulos preservados de esta manera pueden durar de 6 a 12 meses (5,7).

### **3. AISLAMIENTO DE *Rhizobium***

- Los nódulos desecados se rehidrataron antes de desinfectarlos. Se colocaron en vasos de precipitar pequeños con agua estéril fría y se dejaron en el refrigerador toda la noche para que absorbieran el agua.
- Los nódulos intactos y sin daño se sumergieron 5-10 segundos en etanol al 95 %.
- Se transfirieron a una solución de hipoclorito de calcio al 3 % por 5 minutos.
- Se lavaron en 5 recipientes estériles con agua estéril (se utilizaron cajas de petri plásticas y recipientes de vidrio).
- Los nódulos se rompieron en una gota de agua estéril dentro de una caja de petri. La suspensión nodular fue sembrada en agar manitol-levadura más azul de bromotimol, flameando entre cada estría.
- Se incubó a 25-30 grados centígrados en oscuridad, 4 a 10 días. Se buscaron colonias aisladas típicas de *Rhizobium*.
- Cada colonia diferente se aisló en agar levadura manitol más azul bromotimol.
- Se incubó y observó diariamente la aparición de colonias típicas de *Rhizobium*.
  - Azul de bromotimol: un color amarillo debido a la producción de ácido de *Rhizobium* de crecimiento rápido.
- Se observaron a los 5 días después.

- Las pruebas preliminares para identificación presuntiva de *Rhizobium* fueron: la morfología colonial (colonias de 2-5 mm de diámetro, elevadas y mucosas), la producción de ácido, la reacción Gram. (bacilo Gram. negativo) y montajes en fresco para observar movilidad (móvil).
- Para su conservación se transfirieron a tubos de cultivo con agar manitol levadura (5, 7).
- Las muestras en donde no hubo crecimiento se analizaron nuevamente incrementando así la recuperación de bacterias.

#### **4. IDENTIFICACIÓN DE *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli***

- La identificación se realizó por medio de la infección de *Phaseolus vulgaris* por las cepas aisladas (5, 7, 22-24).
- Se utilizaron bolsas de crecimiento de propileno aproximadamente de 16\*18 cm, con una hoja de papel filtro en el interior y un canal hecho del mismo papel en el borde superior.
- En el interior de la bolsa se colocaron 50 ml. de solución nutritiva para planta; y luego se esterilizaron en autoclave.
- Esterilización de la superficie de las semillas:
  - Se seleccionaron semillas de viabilidad buena, libres de daño y fueron lavadas con agua y secadas con papel absorbente.
  - Las semillas fueron colocadas en un erlenmeyer autoclaveado.

- La desinfección se realizó con alcohol al 95% por 10 segundos. Luego con hipoclorito de calcio al 3% por 5 minutos en volumen suficiente para cubrir todas las semillas. Se descartó la solución.
- Se lavó con agua estéril, 6 veces.
- Por último se agregó suficiente agua y se dejaron las semillas en el refrigerador por 4 horas.
- Se trasladaron asépticamente las semillas a una caja de petri que contenía dos láminas de papel filtro esterilizado (20 semillas por caja de petri ).
- Se dejaron las semillas 24 a 48 horas para que germinarán.
- Se seleccionaron las semillas germinadas y de radículas de 1-1.5 cm. de largo y se transfirieron a una bolsa de crecimiento, con la raíz en el interior de la bolsa.
- Las plantas se dejaron crecer de 5-7 días antes de ser inoculadas (5-7,21,22).
- PREPARACIÓN DEL INÓCULO: La técnica utilizada es la sugerida por Vincent y Somasegaran (5-7).
  - Suspensión inicial: A partir del cultivo puro obtenido de las cepas aisladas sospechosas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, se tomaron 10 asadas de las colonias y se colocaron en 5 ml. de caldo manitol levadura (ML). De esta suspensión se agregó 1ml a una bolsa de crecimiento (4 repeticiones).
  - A partir de la suspensión inicial se realizaron cinco diluciones 1:5, seriadas, con cuatro repeticiones para cada dilución, de la manera siguiente:

- Dilución 1: 1ml del anterior + 4ml de caldo ML (dilución 1:5).  
1ml para cada bolsa de crecimiento.
  - Dilución 2: 1ml del anterior + 4ml de caldo ML (dilución 1:25).  
1ml para cada bolsa de crecimiento.
  - Dilución 3: 1ml del anterior + 4ml de caldo ML (dilución 1:125).  
1ml para cada bolsa de crecimiento.
  - Dilución 4: 1ml del anterior + 4ml de caldo ML (dilución 1:625).  
1ml para cada bolsa de crecimiento.
  - Dilución 5: 1ml del anterior + 4ml de caldo ML. (dilución 1:3125). 1ml para cada bolsa de crecimiento.
- 
- Se dejaron 21 días con luz permanente, evaluándose periódicamente en busca en nodulación o alguna posible contaminación.
  - Se utilizó como control negativo: una bolsa de crecimiento sin inocular.
  - Las cepas identificadas se conservaron en tubos con agar manitol-levadura y aceite mineral en la superficie (5-7).

**5. INTERPRETACION DE RESULTADOS:** Se realizó un análisis de datos descriptivo, mediante la utilización de tablas, gráficas y porcentajes. Las cepas que se aislaron de nódulos se consideraron sospechosas de *Rhizobium*, si poseían las siguientes características: morfología colonial característica, productores de ácido y eran bacilos Gram negativo móviles. La identificación de *Rhizobium* realizada por infección de la planta se analizó según la técnica de número más probable (NMP) de Brockwell (5-7);

en la cual se evalúa presencia o ausencia de nódulos en cada dilución y repetición. Se consideró *Rhizobium* aquella bacteria que presentó nodulación en al menos una dilución.

A cada cepa aislada e identificada se le adjuntó la siguiente información: aldea y municipio de donde se recolectó, variedad de frijol, fertilización química, y los análisis de suelo realizados previamente por el ICTA.

## VII. RESULTADOS

El cuadro No. 1 muestra un resumen de los resultados del trabajo efectuado en las 68 muestras recolectadas de nódulos de *Rhizobium* en Jutiapa y Chimaltenango. Del total de muestras se observa que se aislaron 40 cepas que presentan características morfológicas de *Rhizobium*. Por otro lado se observan 24 muestras sin crecimiento bacteriano.

**CUADRO No.1**

**Aislamiento bacteriano obtenido a partir de muestras de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Anexo No. 4)**

MUESTRAS	CANTIDAD	PORCENTAJE
Cepas con características de <i>Rhizobium</i>	40	59
Cepas con características diferentes a <i>Rhizobium</i>	4	6
Cultivos sin crecimiento bacteriano	24	35
<b>TOTAL</b>	<b>68</b>	<b>100</b>

Fuente: datos experimentales

Las 40 cepas seleccionadas en el cuadro No. 2 poseen características morfológicas de *Rhizobium*, Todas presentan colonias amarillas, tamaño de 3-6 mm. de diámetro, la mayoría son mucosas, de bordes regulares y elevadas. Las 40 cepas son bacilos gram negativo móviles. El resto de cepas no incluidas en el cuadro No. 2 presentaron características diferentes a las anteriores por lo que no se consideraron sospechosas de *Rhizobium*.

CUADRO No. 2

Características morfológicas de las bacterias consideradas sospechosas de *Rhizobium*

No	CARACTERISTICAS COLONIALES						Morfología	Gram	Movilidad
	Color	Mucosidad	Bordes	Altura	Tam.	Pigmentos			
1	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
6	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	3 mm	Presentes	bacilos	-	+
7	Amarillo	Ausente	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
9	Amarillo	Ausente	Regulares	Elevada	6 mm	Ausente	bacilos	-	+
13	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	3 mm	Ausente	bacilos	-	+
16	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	3 mm	Ausente	bacilos	-	+
17	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	3 mm	Presentes	bacilos	-	+
19	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
20	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
21	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
22	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
25	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
26	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
28	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
31	Amarillo	Ausente	Regulares	Elevada	3 mm	Ausente	bacilos	-	+
32	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
36	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
37	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	cocobacilo	-	+
38	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	3 mm	Ausente	bacilos	-	+
39	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
40	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	3 mm	Ausente	bacilos	-	+
41	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
42	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
43	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
44	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
45	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
46	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
47	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	3 mm	Ausente	bacilos	-	+
48	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
49	amarillo	Ausente	Irregulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
53	Amarillo	Ausente	Regulares	Plana	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
56	Amarillo	Ausente	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
58	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
59	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Presentes	cocobacilo	-	+
61	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
63	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	4 mm	Presentes	bacilos	-	+
64	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
65	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
66	Amarillo	Abundante	Regulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+
68	Amarillo	Abundante	Irregulares	Elevada	4 mm	Ausente	bacilos	-	+

Fuente: datos experimentales.

El cuadro No. 3 muestra los resultados resumidos de la segunda fase del estudio, en la que se buscó confirmar o rechazar la pertenencia al género *Rhizobium* de los 40 aislamientos bacterianos, seleccionados en la primera fase de la investigación. El resultado más importante de esta fase es que se obtuvieron 23 cepas que fueron capaces de formar nódulos en la variedad de frijol ICTA-HUNAPU estudiada.

**CUADRO No. 3**

**Infección de *Phaseolus vulgaris* por las cepas con características de *Rhizobium***

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	PORCENTAJE
Cepas aisladas que nodularon <i>Phaseolus vulgaris</i>	23	58
Cepas que no nodularon <i>Phaseolus vulgaris</i> (no infectivas)	17	42
<b>TOTAL DE CEPAS</b>	40	100

Fuente: datos experimentales

En el cuadro No. 4 se presentan los resultados detallados de la respuesta de infectividad en las plantas de frijol por las cepas 40 cepas estudiadas. Las 23 cepas que se consideraron infectivas nodularon la variedad de frijol ICTA-HUNAPU en al menos una dilución. Las cepas No. 9, 21, 36 y 41 presentaron un Número más propable (NMP) alto.

**CUADRO No. 4**  
**Infectividad de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* en *Phaseolus vulgaris* variedad ICTA- HUNAPU**

No. de Cepa	NUMERO DE RESPUESTAS A LA INOCULACIÓN DE CUATRO REPETICIONES						CARAC-TERISTICA*	NMP
	Dilución de bacteria utilizada							
	1:1	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125		
1	2	2	0	0	0	0	220000	2.1-14.3
6	0	0	0	0	0	0	000000	0-0
7	2	2	0	0	0	0	220000	2.1-14.3
<b>9</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>444300</b>	<b>542.3-3666.0</b>
13	3	3	0	0	0	0	330000	4.3-29.8
16	0	0	0	0	0	0	000000	0-0
17	0	0	0	0	0	0	000000	0-0
19	0	0	0	0	0	0	000000	0-0
20	0	0	0	0	0	0	000000	0-0
<b>21</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>444320</b>	<b>2092..3-14144.0</b>
22	0	0	0	0	0	0	000000	0-0
25	0	0	0	0	0	0	000000	0-0
26	3	2	0	0	0	0	320000	3.3 a 22.6
28	3	2	0	0	0	0	320000	3.3 a 22.6
31	4	3	2	0	0	0	432000	16.7 a 113.3
32	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
<b>36</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>444444</b>	<b>9692.3 a 65520.0</b>
37	2	2	0	0	0	0	220000	2.1 a 14.3
38	4	4	3	3	0	0	443300	31.5 a 733.2
39	2	1	0	0	0	0	210000	1.5 a 10.4
40	2	3	0	0	0	0	230000	12.0 a 18.7
<b>41</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>444422</b>	<b>1357.6 a 9178.0</b>
42	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
43	2	1	0	0	0	0	210000	1.5 a 10.4
44	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
45	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
46	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
47	1	2	0	0	0	0	120000	1.3 a 9.1
48	2	3	0	0	0	0	230000	12.0 a 18.7
49	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
53	1	1	0	0	0	0	110000	0.4 a 2.8
56	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
58	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
59	2	2	0	0	0	0	220000	2.1 a 14.3
61	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
63	0	0	0	0	0	0	000000	0 a 0
64	3	3	0	0	0	0	330000	4.3 a 29.8
65	4	2	2	0	0	0	422000	10.8 a 73.5
66	3	3	0	0	0	0	330000	4.3 a 29.8
68	3	3	0	0	0	0	330000	4.3 a 29.8

\* La característica muestra la agrupación de las repuestas positivas en cada dilución, y a partir de ella se consultaron las tablas de NMP establecidas por Brockwell (7).

Fuente: datos experimentales

**CUADRO No. 5: Cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y características del suelo \* (Anexo No.5)**

No.	ALDEA	MUNICIPIO	nódulos (mm)	NUTRIENTES									pH	%Materia	
				Ca*	Mg*	Cu*	Fe*	Mn*	Zn*	K**	P**	N***		Orgánica	textura
<b>JUTIAPA</b>															
1	El Guayabo I	Sta. Catarina Mita	1--2	medio	medio	bajo	medio	Alto	bajo	medio	medio	medio	ácido	medio	Franco Arcilloso
7	El Limón I	Sta. Catarina Mita	2	medio	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	bajo	medio	ácido	medio	Arcilloso
9	La Unión	Sta. Catarina Mita	2	medio	bajo	bajo	bajo	Alto	bajo	bajo	bajo	medio	ácido	medio	Arcilloso
13	Río de la Virgen II	Jutiapa	1--2	medio	bajo	medio	bajo	medio	bajo	bajo	medio	medio	ácido	medio	Franco arcillo-arenoso
21	El Retiro II	Quezada	2	medio	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	bajo	medio	ácido	medio	Arcilloso
26	Nueva Esperanza II	Jutiapa	3--4	medio	bajo	bajo	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	ácido	medio	Arcilloso
28	La Lagunita II	Jutiapa	2--3	alto	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	alto	medio	alcalino	medio	Arcilloso
31	Animas Lomas I	Jutiapa	2	alto	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	alto	medio	neutro	alto	Franco
36	La Barranca	Sta. Catarina Mita	2	medio	bajo	bajo	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	neutro	medio	Arcilloso
37	El Quebracho I	Sta. Catarina Mita	2	medio	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	bajo	medio	ácido	alto	Arcilloso
38	El Quebracho II	Sta. Catarina Mita	1--2	medio	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	bajo	medio	ácido	alto	franco arcilloso
39	Las Pozas I	El Progreso	3--4	medio	bajo	bajo	medio	medio	bajo	medio	medio	medio	ácido	alto	Franco arcillo arenoso
40	Las Pozas II	El Progreso	3--4	medio	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	medio	medio	ácido	alto	Franco arcillo arenoso
41	El Ovejero I	El Progreso	3--4	medio	bajo	bajo	bajo	medio	bajo	medio	medio	medio	ácido	medio	Franco arcillo arenoso
43	Amayo Ingenio I	Jutiapa	4	medio	bajo	bajo	medio	medio	bajo	medio	medio	medio	ácido	medio	Franco arcillo arenoso
47	El Carrizal	Jutiapa	3--4	medio	bajo	bajo	medio	medio	bajo	medio	bajo	medio	ácido	medio	Arcilloso
48	Guachipilín I	Comapa	2--3	medio	alto	bajo	bajo	medio	bajo	medio	alto	medio	neutro	medio	Arcilloso
53	Buena Vista II	Comapa	3	medio	bajo	medio	bajo	medio	bajo	medio	bajo	medio	ácido	medio	Arcilloso
<b>CHIMALTENANGO</b>															
59	Santa Cruz Balanyá I	San Martín Jilotepeque	1--2	bajo	bajo	bajo	medio	medio	bajo	medio	medio	bajo	ácido	medio	Franco Arenoso
64	Patzún Saquiyá	Patzún	1--2	medio	bajo	bajo	medio	medio	bajo	medio	medio	medio	ácido	medio	Franco arcilloso
65	Patzún San Jay	Patzún	1--2	medio	bajo	bajo	medio	medio	bajo	medio	medio	medio	ácido	medio	Franco Arenoso
66	Chirijuyú	Tecpán	2--3	medio	medio	medio	bajo	medio	bajo	medio	bajo	medio	ácido	medio	Franco arcillo arenoso
68	Las Mejoranas	Santa Polonia	2--3	alto	bajo	bajo	bajo	medio	medio	medio	alto	medio	neutro	alto	Franco arcillo arenoso

\* mg/kg suelo \*\* cg/kg suelo \*\*\* %p/p

Fuente: datos experimentales e Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA)

El cuadro No. 5 muestra una serie de características relacionadas con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Se puede observar que el tamaño de nódulos varió de 1-4 mm. de diámetro. Los nódulos grandes se obtuvieron en su mayoría de suelo con textura franco arcillo arenosa. El pH del suelo predominante fue el ácido. No se evidenció ninguna relación entre los nutrientes del suelo.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la primera fase del estudio se aislaron 40 (59%) cepas que presentaron características típicas de *Rhizobium*. Con respecto a la morfología colonial se puede observar que todas presentaron coloración amarilla, lo que indica la producción de ácido evidenciado por el indicador azul de bromotimol utilizado en el medio de cultivo y como se describió en los antecedentes *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, pertenece al grupo de *Rhizobium* de crecimiento rápido con producción de ácido. Además la morfología colonial que predomina en las 40 muestras es de colonias elevadas, mucosas, los bordes de regulares a irregulares, pigmentación variable y tamaño de 3-6 mm de diámetro. Aspectos que corresponden a la morfología colonial descrita en la literatura sobre *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (9-12).

Los 24 aislamientos restantes, correspondientes a un 35 % de las muestras totales, fueron negativos, es decir que no se obtuvo crecimiento. Las causas de estas pérdidas desde la colecta al aislamiento pudieron deberse a los siguientes aspectos:

a) Los nódulos colectados se almacenaron durante aproximadamente 2 meses antes del aislamiento de la bacteria, tiempo en el que el *Rhizobium* de algunas muestras pudo morir por efectos de manejo durante el proceso de deshidratación y almacenaje.

b) El hipoclorito de calcio es un desinfectante fuerte, que se utilizó para esterilizar la parte externa de los nódulos, mismo que pudo penetrar en nódulos con alguna herida en el proceso de manejo y causar la muerte de *Rhizobium*.

c) Según Quispel, las plantas pueden formar pseudo nódulos; debido a la proliferación de células corticales y epidermales; que entran en contacto con los Rizobios incapaces de nodular al huésped específico ocasionando entonces pseudo nódulos con ausencia de bacteria (12).

d) Existen otros microorganismos que pueden formar estructuras semejantes a los nódulos como las bacterias del género *Agrobacterium*, los cuales se diferencian únicamente por el color interno del mismo y por ser más pálidos en su superficie (12).

Cuatro cepas, correspondientes al 6% del total de muestras analizadas fueron rechazadas ya que una o más de las características típicas de *Rhizobium* no fueron cumplidas.

En el Cuadro No. 3 se observa que de las 40 cepas aisladas sospechosas de *Rhizobium*, sólo 23 de ellas nodularon las plantas de frijol común de la variedad ICTA-HUNAPU, utilizada en las pruebas de infectividad. Estas cepas que infectaron el frijol común tienen alta probabilidad de ser *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, sin embargo para la identificación definitiva es necesario realizar estudios más específicos, como análisis de ADN; ya que en un estudio realizado por Martínez se describe que existen cepas diferentes a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* capaces de nodular el frijol, entre las que se pueden mencionar: *Rhizobium etli*, *Rhizobium gallicum* biovar *phaseoli* y *Rhizobium Giardinii* biovar *phaseoli* (25).

En este mismo cuadro se muestra que 17 de las cepas inoculadas no infectaron al frijol, esta situación se puede interpretar de dos formas: que las 17 cepas no sean *Rhizobium*

*leguminosarum* biovar *phaseol*; o que la variedad de frijol ICTA-HUNAPU utilizada como huésped no haya sido específica para las cepas inoculadas.

El detalle de la acción de infectividad de las 40 cepas inoculadas se presenta en el cuadro No. 4, en el que se muestra la capacidad de infección de cada cepa y el número más probable (NMP) de cepas de *Rhizobium* presentes en cada aislamiento. Esta técnica de enumeración mediante infección de planta es un método indirecto que permite establecer la cantidad de bacterias viables capaces de producir infección. Este método depende de la habilidad de cada *Rhizobium* para producir nódulos en las especies de leguminosas estudiadas, asumiendo que una célula de *Rhizobium* es capaz de inducir a la nodulación (7).

Las cepas más infectivas fueron: La cepa No. 9 fue aislada de la Aldea La Unión, Santa Catarina Mita; la cepa 21 aislada del El Retiro II, Quezada; la cepa 36 de La Barranca, Santa Catarina Mita y la cepa 41 de El Ovejero I, El Progreso. Estas presentaron un NMP más alto que las demás. Particularmente la cepa No. 36 fue capaz de infectar todas las repeticiones de las diluciones realizadas, por lo que se considera la cepa más infectiva. Las cepas de infectividad alta podrían ser muy efectivas para la fijación de nitrógeno, aunque no siempre existe relación entre infectividad y efectividad.

El análisis rutinario efectuado en el laboratorio a los suelos permite interpretar principalmente las necesidades nutricionales de las plantas que en él se siembran, no así el de las bacterias que en él se desarrollan, ya que como organismos totalmente diferentes a las plantas sus necesidades son distintas y para el conocimiento de su capacidad de supervivencia y desarrollo se requiere de estudios más complejos.

Existen algunos aspectos sobre las necesidades de temperatura, humedad y pH del suelo, así como algunas de las condiciones nutricionales que deben prevalecer en el mismo para facilitar el desarrollo de *Rhizobium* y una adecuada relación simbiótica con su huésped.

El tamaño de los nódulos en la planta y su color ha sido un parámetro que ayuda a efectuar una interpretación a priori de las condiciones en las que se está dando la simbiosis y con ella se pueden hacer algunas inferencias a futuro para realizar otros trabajos de observación de comportamiento. Utilizando este parámetro se observa en el cuadro No. 5 que los aislamientos se efectuaron a partir de 3 tamaños de nódulos: pequeños (1-2 mm), medianos (2-3 mm) y grandes (3-4 mm). Los aislamientos de nódulos grandes se encontraron en los suelos: Nueva Esperanza II, La Pozas I, Las Pozas II, El Ovejero I y Amayo Ingenio I, todos en el Departamento de Jutiapa. Entre todos los factores del suelo analizados (pH, nutrientes, materia orgánica, etc.) el único que es coincidente en un 80 % es la textura del suelo, la cual corresponde a suelos franco arcillo arenosos, que tienen dentro de sus características un mejor equilibrio del agua y la aireación, factor que puede haber influido en mejores condiciones para el desarrollo de las raíces de las plantas y del *Rhizobium*.

Para el caso de los nódulos medianos, se aislaron cepas de los suelos La Lagunilla II en Jutiapa; Chirijuyu y La Mejoranas en Chimaltenango. Los dos suelos de Chimaltenango mostraron de nuevo que el factor concordante fue la textura franco arcillo arenosa, aunque se observa otro aspecto interesante y diferencial en el suelo de Las Mejoranas, el cual está relacionado con una cantidad alta de calcio, elemento que es muy requerido por los

rizobios. Para el caso del suelo de La Lagunilla el factor diferencial pudo ser también la presencia de buena cantidad de calcio ya que los otros factores no se observa que hayan influido.

El valor del pH tiene mucha importancia en el desarrollo de las bacterias y en la disponibilidad de muchos elementos en el suelo, principalmente para que las plantas puedan desarrollar adecuadamente sus actividades fisiológicas. Las investigaciones han encontrado que el *Rhizobium* funciona bien en los suelos con un pH agrícola neutro (6.6-7.3), pero han encontrado que en suelos ácidos con pH hasta de 4.7 donde existen variedades de frijol creciendo adecuadamente, la bacteria también lo hace y la simbiosis puede ser productiva tanto para el huésped como para el hospedero, por lo tanto se considera que la variabilidad de pH encontrados en estos suelos no fue la limitante para la expresión de tamaño de los nódulos.

Se observó que ninguna de las cepas de *Rhizobium* con un NMP alto, como en el caso de los aislamientos No. 9, 21, 36 y 41 correspondieron a los aislamientos provenientes de los nódulos más grandes que fueron colectados en las comunidades ya mencionadas.

## IX. CONCLUSIONES

- A. En los municipios de Jutiapa y Chimaltenango, se aislaron de nódulos de frijol común 23 cepas que poseen alta probabilidad de ser *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.
- B. Las cepas identificadas como *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, procedentes de La Unión, Santa Catarina Mita; El Retiro II, Quezada; La Barranca, Santa Catarina Mita y El Ovejero I, El Progreso poseen alta infectividad.
- C. Las cepas aisladas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* se obtuvieron tanto de nódulos pequeños como grandes (1-4 mm. de diámetro).
- D. Las características del suelo que presentaron relevancia fueron el pH ácido observado en la mayoría de muestras y la textura franco arcillo arenosa relacionada con la presencia de nódulos grandes.

## X. RECOMENDACIONES

- A. Evaluar las 23 cepas aisladas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, con el fin de establecer su potencial como fijadoras de nitrógeno en las distintas variedades comerciales de frijol.
  
- B. Realizar estudios similares en otras regiones del país que incrementen la colección de cepas de Guatemala y en consecuencia se obtenga un cepario de mayor variabilidad genética de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.
  
- C. Caracterizar genéticamente las 23 cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* para establecer la variabilidad de cepas aisladas en este estudio.

## XI. REFERENCIAS

1. Martínez E, Martínez J. Microbios en línea: *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Centro de investigación sobre fijación de Nitrógeno, UNAM. 1998.  
< [www.Biblioweb.dgsca.UNAM.mx/libros/microbios/cap.8/](http://www.Biblioweb.dgsca.UNAM.mx/libros/microbios/cap.8/) >
2. Aguilera R. Evaluación del efecto simbiótico de 14 cepas de *Rhizobium phaseoli* en tres variedades de frijol negro en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1974. 39 p.
3. Hirsch A. *et al.* What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special ? Plant Physiol. 2001;127:1484-1492.
4. Strugaard J. Regulators and Regulation of legume root nodule development. Plant Physiol. 2000;124:532-540
5. Somasegaran P, Hoben H. Methods in legume-*Rhizobium* Technology. Hawaii, United States of América: University of Hawaii NifTAL projecta and MIRCEN,1985. 369 p.
6. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Simbiosis leguminosa-rhizobio; Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Colombia: Proyecto CIAT-UNDP, Doc. Tec. 1987. 178 p.
7. Vincent J. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Great Britain: BURGESS AND SON, 1970. Xi+164 p.
8. Soberon-Chávez G. Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum* lacking symbiotic information Can. J. Microbiol. 1989;35:464-468.

9. WATEROSE. Microbiological analysis of nitrogen cycle: Isolation and identification of *Rhizobium* and *Azotobacter*. 1998. [www.geocities.com/wateros\\_test/labs15.html](http://www.geocities.com/wateros_test/labs15.html).
10. Walker N. Soil Microbiology. London, United Kingdom: Butterworths, 1975. 262 p.
11. Martin A. Introduction to Soil Microbiology. 2 ed. United States of America: Wiley Johns & Sons, 1977. 487 p.
12. Quispel A. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1974. 769 p.
13. Horton H. *et al.* Bioquímica. México: Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., 1995. 22.36 p.
14. Solis A. Evaluación de la efectividad de inoculación de cepas mixtas de *Rhizobium phaseoli* en dos variedades de frijol común. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1980. 55p.
15. Méndez J. Evaluación en Guatemala de 9 cepas de *Rhizobium phaseoli* seleccionadas para pruebas internacionales de fijación de nitrógeno en frijol, probadas en la variedad ICTA81. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1982. 40 p.
16. Campos S. Aislamiento de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de 4 departamentos de Guatemala y observación preliminar de su comportamiento en la variedad San Martín de *Phaseolus vulgaris*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1986. 38 p.

17. Miyares F. Evaluación de 13 cepas de *Rhizobium phaseoli* nativas de Guatemala en variedades de frijol negro Quetzal y Jutiapan. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1997. 29 p.
18. Contreras J. Evaluación de Fijación de Nitrógeno producido por cuatro cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación. Facultad de Agronomía) 1988. 30 p.
19. Carrillo H. Evaluación de Fijación de Nitrógeno de 4 cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* en la variedad de frijol quinak-ché. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1990. 40 p.
20. Castellanos, M. Efecto del cultivo continuo en la fijación biológica de nitrógeno de la simbiosis *Rhizobium leguminosarum* - *Phaseolus vulgaris*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia) 1990. 49p.
21. Anyango B. *et al.* Diversity of Rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Appl. Environ Microbiol.* 1995; 61:4016-4021.
22. Borardi J, Galar L. Nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. as affected by *Rhizobium phaseoli* growth phase. *Can. J. Microbiol.* 1988;34:63-66.
23. Bécquer, C. *et al.* Caracterización Fisiológica-Bioquímica de cepas de Rizobios, aislados en leguminosas forrajeras. *Rev Biol.* 2000;14: 1-11.
24. Hara, G. *et al.* Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculant performance and increase legume productivity in stressful environments. Australia: ACIAR, 2002. 6 pp.

25. Martinez, E. Diversity *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*. 2003;252: 11-23.
26. Dowling D, Broughton W. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 1986;40: 131-137.
27. Aguilar J. Utrera J. Manual Agrícola. Guatemala: Productos SuperB Agrícola, 2002. 367 p.
28. Soto J, García M. Recolección, aislamiento e identificación de cepas de bacterias nativas de Jutiapa y Chimaltenango, del género *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*, para el aprovechamiento de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol. Guatemala: ICTA, 2004. 44 p.

## **XII. ANEXOS**

## ANEXO No. 1

Clasificación por grupos de *Rhizobium*


---

Grupo I: *Rhizobium* de crecimiento rápido, productores de ácido con 2-6 flagelos peritricales. Las colonias miden 2-4 mm. A los 3-5 días de incubación en agar manitol-levadura. Aislados de leguminosas de regiones templadas.

---

ESPECIE	HUÈSPED
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. trifolii</i>	<i>Medicago, Meliloti, Tregonella</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>Trifolium</i>

---

Grupo II: *Rhizobium* de crecimiento lento, productoras alcalinas, con flagelos, las colonias son menores de 1 mm de diámetro a los 5-7 días en placas de agar Manitol-levadura. Nodulan leguminosas tropicales.

---

ESPECIE	HUÈSPED
<i>R. japonicum</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>
<i>R. lipini</i>	<i>Vigna, Desmodium, Archis, Centrocema, Stylosanthes, etc</i>

---

Fuente: referencia No. 1

## ANEXO No.2

Tabla 1. Morfología de *Rhizobium* obtenido directamente de nódulos

MORFOLOGIA CON TINCIÓN GRAM	
FORMA	Recto
CONTORNO	Redondeados
BORDES	1:4
TAMAÑO ( ANCHO:LARGO)	parejas, cadenas y en racimo
AGRUPACIONES	negativo
REACCIÓN GRAM	3-5 gránulos púrpuras redondeados dentro de la bacteria.
OTROS	

MORFOLOGÍA COLONIAL DE *Rhizobium*

Morfología de las colonias de *Rhizobium* en agar manitol-levadura incubados a 30 grados por tres días

Tamaño	2-4 mm de diámetro
Forma	colonia circular
Pigmentación	blanca opaca ó leñosas translucidas
Elevación	Elevada o plana
Borde	liso
Superficie	lisa
Estructura	amorfa
Consistencia	viscosa



- Agar 15 gramos
- Azul de bromo timol 5 ml.
  
- Colorante azul de bromotimol
  - Solución Stock : 0.5g/100ml etano 1. Agregar 5 ml de la solución Stock por litro de agar manitol levadura.
  
- Solución nutriente para planta:
  - SOLUCION 1**
    - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  294 grs./litro
  - SOLUCIÓN 2**
    - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  136.1 g/litro
  - SOLUCIÓN 3**
    - Fe-citrato 6.7 g/litro
    - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  123.3 g/litro
    - $\text{K}_2\text{SO}_4$  87 g/litro
    - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.338 g/litro
  - SOLUCIÓN 4**
    - $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.247 g/litro
    - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.288 g/litro
    - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.100 g/litro
    - $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.056 g/litro
    - $\text{Na}_2\text{MO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . 0.048 g/litro

Tomar 5 ml de cada solución 1-4, agregar 5 litros de agua, y luego diluir a 10 litros.

Utilizar NaOH 1N para ajustar el pH de 6.6-6.8.

## ANEXO No. 4: LISTADO DE MUESTRAS

No.	ALDEA	MUNICIPIO	DEPARTAMENTO	VARIEDAD	FERTILIZANTE
1	El Guayabo I	Santa Catarina Mita	Jutiapa	R77	No se sabe
2	El Guayabo II	Santa Catarina Mita	Jutiapa	N ligero	No se sabe
3	El Guayabo III	Santa Catarina Mita	Jutiapa	R93	No se sabe
4	El Rodeo	Santa Catarina Mita	Jutiapa	negro criollo	No se sabe
5	Aldea Nueva I	Santa Catarina Mita	Jutiapa	no se sabe	No se sabe
6	Aldea Nueva	Santa Catarina Mita	Jutiapa	no se sabe	No se sabe
7	El Limón I	Santa Catarina Mita	Jutiapa	negro ligero	No se sabe
8	El Limón I	Santa Catarina Mita	Jutiapa	negro ligero	No se sabe
9	La Unión	Santa Catarina Mita	Jutiapa	no se sabe	No se sabe
10	El Rodeo VII	Santa Catarina Mita	Jutiapa	negro criollo	No se sabe
11	Suchitán	Santa Catarina Mita	Jutiapa	negro	No se sabe
12	Río La Virgen	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	No se sabe
13	Río de la Virgen II	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	No se sabe
14	Santa Gertrudis I	Quezada	Jutiapa	vaina blanca	sí
15	Santa Gertrudis II	Quezada	Jutiapa	ligero	sí
16	La Brea I	Quezada	Jutiapa	Santa Gertrudis	sí
17	La Brea II	Quezada	Jutiapa	no se sabe	sí
18	Los Comunes I	Quezada	Jutiapa	vaina blanca	no
19	Los comunes I	Quezada	Jutiapa	ligero	no
20	Los comunes II	Quezada	Jutiapa	Cuarenteño	sí
21	El Retiro II	Quezada	Jutiapa	Chichicaste	Sí
22	Las Animas San Antonio	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	no
23	Cerro Grande	Jutiapa	Jutiapa	Ostúa	no
24	Cerro Grande II	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	no
25	Nueva Esperanza	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	sí
26	Nueva Esperanza II	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	Sí
27	La lagunita I	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	no
28	La Lagunita II	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	No
29	Piedra Pintada I	Jutiapa	Jutiapa	mejorada	no
30	Piedra Pintada II	Jutiapa	Jutiapa	mejorada	no
31	Cantón Animas Lomas	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	No
32	Cantón Animas Lomas	Jutiapa	Jutiapa	sopita	sí
33	El Cuje I	Jutiapa	Jutiapa	Chichicaste	sí
34	El Cuje II	Jutiapa	Jutiapa	no se sabe	no
35	Guacamaya II	Jutiapa	Jutiapa	mejorada	no
36	La Barranca	Santa Catarina Mita	Jutiapa	vaina blanca	Sí
37	El Quebracho I	Santa Catarina Mita	Jutiapa	ligero	Sí
38	El Quebracho II	Santa Catarina Mita	Jutiapa	ligero	no
39	Las Pozas I	Progreso	Jutiapa	vaina morada	Sí
40	Las Pozas II	Progreso	Jutiapa	vaina morada	Sí
41	El Ovejero I	Progreso	Jutiapa	dor-390	Sí
42	El Ovejero II	Progreso	Jutiapa	no se sabe	si
43	Amayo Ingenio I	Jutiapa	Jutiapa	Rojo seda	Sí

<b>No.</b>	<b>ALDEA</b>	<b>MUNICIPIO</b>	<b>DEPARTAMENTO</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>FERTILIZANTE</b>
44	Amayo Ingenio I	Jutiapa	Jutiapa	ligero	Sí
45	María Montaña II	Jutiapa	Jutiapa	vaina morada	Sí
46	La Brea María Montaña	Jutiapa	Jutiapa	criollo	Sí
47	El Carrizal	Jutiapa	Jutiapa	criollo	Sí
48	Guachipilín I	Comapa	Jutiapa	Vaina blanca	Sí
49	Santa Bárbara I	Comapa	Jutiapa	ligero	Sí
50	San Cristobal I	Comapa	Jutiapa	cuarenteño	no
51	San Cristobal II	Comapa	Jutiapa	Hondureño	Sí
52	Buena Vista I	Comapa	Jutiapa	ligero	Sí
53	Buena Vista II	Comapa	Jutiapa	chibolita	Sí
54	Los Achiotes	Moyuta	Jutiapa	Ostúa	Sí
55	La Cofradía	Moyuta	Jutiapa	criollo	Sí
56	El Rodeo	Moyuta	Jutiapa	no se sabe	Sí
57	San Pedro	Conguaco	Jutiapa	Hondureño	Sí
58	La Estancia la Virgen	San Martín Jilotepeque	Chimaltenango	no se sabe	No se sabe
59	Santa Cruz Balanyá I	San Martín Jilotepeque	Chimaltenango	altense	No se sabe
60	Santa Cruz Balanyá II	San Martín Jilotepeque	Chimaltenango	Coccinius	no
61	Santa Cruz Balanyá III	San Martín Jilotepeque	Chimaltenango	criollo	No
62	Patzicia I	Patzicia	Chimaltenango	voluble	No
63	Pahuit	Patzicia	Chimaltenango	no se sabe	no se sabe
64	Patzún Saquiyá	Patzún	Chimaltenango	no se sabe	No se sabe
65	Patzún San Jay	Patzún	Chimaltenango	no se sabe	No se sabe
66	Chijuyú	Tecpán	Chimaltenango	no se sabe	No se sabe
67	Panimacoc	Tecpán	Chimaltenango	no se sabe	No se sabe
68	Las Mejoranas	Santa Polonia	Chimaltenango	no se sabe	No se sabe

**ANEXO No. 5 Cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y características asociadas\***

No.	ALDEA	MUNICIPIO	nódulos (mm)	NUTRIENTES								pH	%Materia Orgánica	textura	
				mg/kg suelo				cg/kg sue							%p/p
				Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	K	P				N
<b>JUTIAPA</b>															
1	El Guayabo I	Sta. Catarina Mita	1--2	8.22	3.03	0.17	18.95	70.1	1.31	0.42	15	0.18	5.01	2.8	Franco Arcilloso
7	El Limón I	Sta. Catarina Mita	2	11.62	0.52	0.41	5.16	7.64	0.22	0.86	1	0.18	5.72	3.77	Arcilloso
9	La Unión	Sta. Catarina Mita	2	8.07	0.05	0.39	8.93	70.9	0.09	0.15	7	0.1	5.08	3.77	Arcilloso
13	Río de la Virgen II	Jutiapa	1--2	5.16	0.02	11.84	3.51	6.49	0.29	0.01	29	0.12	5.12	4.03	Franco arcillo-arenoso
21	El Retiro II	Quezada	2	5.99	0.32	0.27	8.06	12	0.09	0.71	1	0.12	6.18	2.29	Arcilloso
26	Nueva Esperanza II	Jutiapa	3--4	6.94	0.04	0.38	4.48	4.4	0.12	0.37	1	0.11	5.37	3.09	Arcilloso
28	La Lagunita II	Jutiapa	2--3	19.57	0.73	0.45	1.32	16.9	1.47	1.34	67	0.15	7.64	3.5	Arcilloso
31	Animas Lomas I	Jutiapa	2	20.38	0	0.46	0.56	24.8	0.88	0.54	221	0.24	7.3	5.38	Franco
36	La Barranca	Sta. Catarina Mita	2	11.09	0.03	0.43	4.41	4.02	0.18	0.71	6	0.11	6.72	2.69	Arcilloso
37	El Quebracho I	Sta. Catarina Mita	2	15.18	0.06	0.45	0.22	11.4	0.08	0.61	3	0.29	6.36	7.93	Arcilloso
38	El Quebracho II	Sta. Catarina Mita	1--2	16.14	0.13	0.46	0.29	11.5	0.06	0.38	1	0.25	6.09	7.53	franco arcilloso
39	Las Pozas I	El Progreso	3--4	7.83	0.07	0.44	11.5	19	0.21	0.28	40	0.21	5.59	6.59	Franco arcillo arenoso
40	Las Pozas II	El Progreso	3--4	15.21	0.01	0.45	3.24	24.5	0.92	0.48	25	0.34	6.43	9.01	Franco arcillo arenoso
41	El Ovejero I	El Progreso	3--4	5.04	0	0.36	5.33	22.3	0.08	0.39	19	0.1	5.8	2.15	Franco arcillo arenoso
43	Amayo Ingenio I	Jutiapa	4	7.72	0.02	0.44	10.94	21.3	0.02	0.31	17	0.1	6.4	2.02	Franco arcillo arenoso
47	El Carrizal	Jutiapa	3--4	5.46	0.06	0.32	16.39	27	0.04	0.69	1	0.11	5.97	2.55	Arcilloso
48	Guachipilín I	Comapa	2--3	15.43	84.5	0.41	2.42	7.27	2.74	0.51	79	0.2	7.34	2.8	Arcilloso
53	Buena Vista II	Comapa	3	4.88	0.71	2.53	3.94	11.9	0.95	0.73	3	0.15	5.83	3.5	Arcilloso
<b>CHIMALTENANGO</b>															
59	Santa Cruz Balanyá I	San Martín Jilotepeque	1--2	2.44	0.03	0.37	18.02	3.59	0.11	0.25	32	0.08	5.49	2.42	Franco Arenoso
64	Patzún Saquiya	Patzún	1--2	5.94	0.04	0.38	29.58	31	0.11	0.48	15	0.16	5.68	3.63	Franco arcilloso
65	Patzún San Jay	Patzún	1--2	4.59	0.1	0.4	10.82	9.75	2.95	0.26	30	0.12	5.82	3.36	Franco Arenoso
66	Chirijuyú	Tecpán	2--3	8.01	2.04	3.82	9.97	15.1	0.08	0.73	1	0.15	6.32	4.03	Franco arcillo arenoso
68	Las Mejoranas	Santa Polonia	2--3	20.39	0.01	0.44	0.26	25.5	14.8	0.38	101	0.24	6.6	6.32	Franco arcillo arenoso

Fuente: datos experimentales e Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA)

\*Las características del suelo fueron proporcionados por el laboratorio de suelos del ICTA

## GUIA PARA LA INTERPRETACION DE ANALISIS DE SUELOS

Cmol/Kg. = meq/100g suelo	RANGO		
	BAJO	MEDIO	ALTO
Ca	4	4-20	>20
Mg	1	1-10	>10
K	0.2	0.2-1.5	>1.5
Mg/kg. = ppm			
P	10	10-40	>40
Mn	5	5-50	>50
Zn	3	3-15	>15
Cu	1	1-20	>20
Fe	10	10-50	>50
% Nitrógeno	> 0.1	0.1-0.4	>0.4
% Materia Orgánica	0.6-2.0	2.1-4.5	>4.5
pH	ácido 5.6-6.5	neutro 6.6-7.3	alcalino 7.4-8.3

Fuente: Kass, D. Fertilidad de Suelos

---

Claudia Lorena Carranza

---

Ing. Agrónomo Rolando Aguilera  
Asesor

---

Licda. Karin Herrera  
Asesor

---

Licda. Maria Luisa de López  
Revisora

---

Licda. Amanda Gálvez  
Revisora

---

Licda. Alba Marina Valdés de García  
Directora

---

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Decano

