

Fondo de Fomento Palmero

cenipalma 35 AÑOS

Evaluación de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas de cobertura del cultivo de palma de aceite

Financiado por el Fondo de Fomento Palmero

Publicación de la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma, financiada por el Fondo de Fomento Palmero.

Consuelo Velasco Zambrano
Directora General (e)

Mauricio Mosquera Montoya
Director de Investigación (e)

Autores
Manuel Rafael Ospino Ballesteros
Auxiliar de investigación, Programa de Agronomía

Luis Guillermo Teherán Sierra
Investigador Posdoctoral, Programa de Agronomía

Nolver Atanacio Arias Arias
Coordinador del Programa de Agronomía

Coordinación editorial
Yolanda Moreno Muñoz

Corrección de estilo
Mónica Silva Saldaña

Diagramación
Estudio 45-8 SAS

ISBN: 978-628-7711-16-7

Fecha de publicación: octubre de 2026

Cenipalma
Calle 98 # 70-91. Piso 14
PBX: (57-601) 3138600
WhatsApp: 321 3084882
Bogotá, D.C., Colombia
www.cenipalma.org



Evaluación de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas de cobertura del cultivo de palma de aceite

Contenido

Introducción 6

1. Generalidades 7

¿Qué son los biofertilizantes? 7

¿Qué son las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas? 9

¿Qué son las leguminosas de cobertura? 10

Beneficios del uso de biofertilizantes en leguminosas 10

Principales leguminosas empleadas en el cultivo de palma de aceite 12

Disponibilidad y uso de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas 15

2. Evaluación de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno 16

¿Por qué evaluar los biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas de cobertura? 16

Alistamiento de semillas de leguminosas 16

Control de calidad de biofertilizantes 24

Inoculación de semillas de leguminosas con biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno 29

Diseño de la prueba de campo 32

Selección de biofertilizantes 39

Glosario 40

Anexo 43

Condiciones de almacenamiento de biofertilizantes 43

Referencias bibliográficas 45

Introducción

Las leguminosas de cobertura constituyen un componente fundamental para mejorar la sostenibilidad de los sistemas de cultivo de palma de aceite. Además de contribuir al manejo de la vegetación acompañante, proteger el suelo contra la erosión y mejorar su estructura, estas plantas aportan nitrógeno al agroecosistema de forma natural mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Este proceso ocurre gracias a una simbiosis con bacterias del suelo, principalmente de los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia* y *Caballeronia*, que colonizan las raíces de las leguminosas y forman nódulos. Dentro de estos, el nitrógeno atmosférico (N_2) se convierte en formas asimilables por la planta, lo que reduce la dependencia de fertilizantes nitrogenados sintéticos, como la urea. Sin embargo, estas bacterias presentan especificidad con respecto a la especie leguminosa y no siempre están presentes en los suelos cultivados. Por ello, es frecuente inocular las semillas para favorecer la fijación efectiva del nitrógeno atmosférico por parte de las leguminosas. Con este propósito, existe en el mercado una amplia diversidad de biofertilizantes.

Esta guía de bolsillo ofrece herramientas prácticas para evaluar el efecto de los biofertilizantes en leguminosas de cobertura utilizadas en el cultivo de palma de aceite, como *Mucuna bracteata*, *Pueraria phaseoloides* (kudzu) y *Desmodium heterocarpon*. Está dirigida a técnicos de campo, investigadores y productores interesados en implementar y validar estrategias de manejo sostenible basadas en la integración efectiva de biofertilizantes simbióticos en la nutrición del cultivo.

1. Generalidades

¿Qué son los biofertilizantes?

Los biofertilizantes son insumos biológicos (bioinsumos) que contienen células vivas o en estado latente de microorganismos benéficos, capaces de mejorar la disponibilidad y la absorción de nutrientes esenciales para las plantas. Estos productos actúan mediante distintos mecanismos, como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas o la movilización de nutrientes en el suelo, de manera que contribuyen a una nutrición más eficiente y sostenible.

Entre los biofertilizantes bacterianos se encuentran aquellos formulados con bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas (BFNS), los cuales son especialmente importantes para cultivos de leguminosas como la soya y el frijol. Entre las BFNS más frecuentes en los biofertilizantes comerciales se encuentran *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., que establecen relaciones simbióticas con las raíces de las leguminosas de cobertura y forman nódulos donde ocurre la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Figura 1).

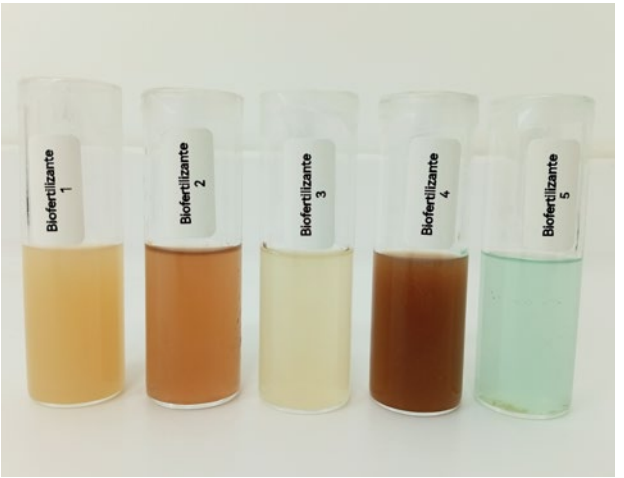


Figura 1. Biofertilizantes disponibles en el mercado a base de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas: 1) *Bradyrhizobium japonicum*; 2) *Bradyrhizobium japonicum*; 3) *Bradyrhizobium japonicum*; 4) *Rhizobium* sp.; 5) *Rhizobium* sp. + *Bradyrhizobium* sp.

En este proceso, las bacterias convierten el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+), una forma asimilable por la planta. Esta asociación reduce la necesidad de fertilizantes nitrogenados sintéticos y mejora la sostenibilidad del sistema agrícola. En leguminosas de cobertura como *Mucuna bracteata*, *Desmodium* spp. y *Pueraria phaseoloides*, el uso de inoculantes con cepas eficientes de *Bradyrhizobium* o *Rhizobium* puede potenciar significativamente la nodulación y el aporte de nitrógeno al sistema de cultivo, con beneficios indirectos para la palma de aceite.

¿Qué son las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas?

Las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas son un grupo especializado de microorganismos del suelo que establecen asociaciones mutualistas con plantas leguminosas. Esta relación les permite colonizar las raíces de las plantas, formar estructuras especializadas llamadas nódulos y, dentro de estos, llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Los géneros bacterianos más representativos en estas asociaciones simbióticas son *Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, entre otros (Figura 2).

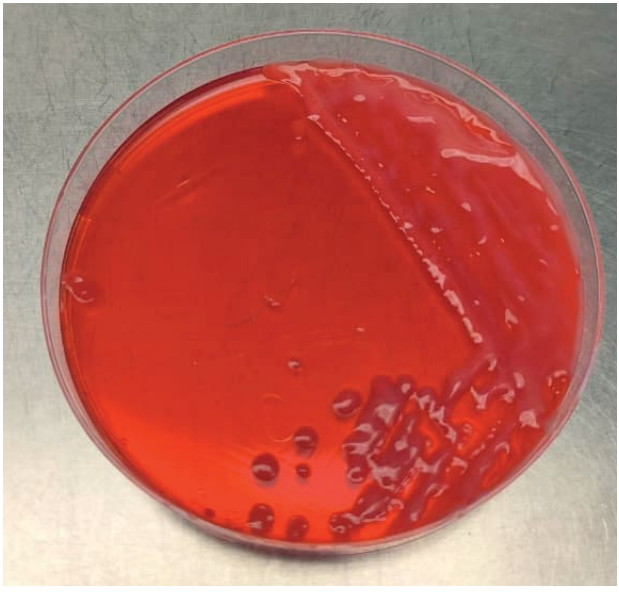


Figura 2. Crecimiento característico de colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas en el medio de cultivo agar YEM (*Yeast Extract Mannitol*).

Cada uno presenta cierto grado de especificidad con respecto a distintas especies de leguminosas. Esta simbiosis representa un componente esencial para el manejo sostenible del suelo, ya que permite reducir el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, contribuye a mejorar la fertilidad del suelo, incrementa la captura de carbono en el agroecosistema, reduce la huella de carbono y favorece la productividad del cultivo principal, en este caso, la palma de aceite.

¿Qué son las leguminosas de cobertura?

Las plantas leguminosas son aquellas que pertenecen a la familia Fabaceae, una de las familias más grandes y diversas del reino vegetal. Se caracterizan por producir semillas en vainas. Se denominan *leguminosas de cobertura* a las plantas leguminosas que se cultivan para cubrir el suelo y contribuir al manejo de cultivos. Cuando estas plantas se establecen como coberturas, no se destinan al consumo humano.

Beneficios del uso de biofertilizantes en leguminosas

El uso de biofertilizantes formulados con BFNS, como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, en leguminosas de cobertura de sistemas de cultivo de palma de aceite representa una práctica sostenible que ofrece los siguientes beneficios agronómicos y económicos (Figura 3):

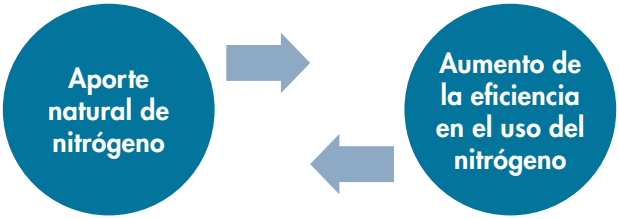


Figura 3. Beneficios del uso de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas de cobertura en el cultivo de palma de aceite.

1. **Aporte natural de nitrógeno.** Estas bacterias permiten a las leguminosas de cobertura fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en formas asimilables por la planta, lo que reduce significativamente la necesidad de emplear fertilizantes nitrogenados sintéticos. Esto favorece la nutrición de las leguminosas de cobertura y, a mediano plazo, mejora la disponibilidad de nitrógeno en el sistema y el reciclaje de nutrientes para el cultivo de palma de aceite.
2. **Aumento de la eficiencia en el uso del nitrógeno.** Los biofertilizantes promueven el aprovechamiento de fuentes naturales de nitrógeno, tanto del fijado biológicamente como del presente en la materia orgánica del suelo. Esta mayor eficiencia en la absorción y el reciclaje del nutriente contribuye a una nutrición más equilibrada del sistema. Como consecuencia, se favorecen el crecimiento vegetativo, el desarrollo del área foliar y la formación de racimos en la palma de aceite, lo que incrementa su productividad y sostenibilidad.

Principales leguminosas empleadas en el cultivo de palma de aceite

Kudzu (*Pueraria phaseoloides*)

Esta especie es la leguminosa de cobertura más ampliamente cultivada en los sistemas de palma de aceite. Se caracteriza por su gran vigor, rápido establecimiento, que generalmente alcanza entre los 5 y 6 meses, y su capacidad para desarrollar un sistema radical profundo. Presenta un hábito de crecimiento voluble, trepador y rastrero, además de abundantes pilosidades distribuidas en sus diferentes estructuras vegetativas.

Posee la capacidad de emitir nuevas raíces y ramas a partir de los nudos, lo que favorece su expansión y la cobertura del suelo. Sus tallos alcanzan un diámetro aproximado de 6 mm. Sus hojas son grandes y trifoliadas, con foliolos delgados de forma triangular-ovalada (Figura 4a). Las flores se disponen en racimos axilares de entre 15 y 30 cm de longitud, generalmente agrupadas en pares (Figura 4b).



Figura 4. Aspecto de flores y del follaje de kudzu (*Pueraria phaseoloides*).

Las vainas pueden alcanzar hasta 11 cm de longitud y se encuentran cubiertas por vellosidades. Cada vaina contiene entre 10 y 20 semillas de aproximadamente 3 a 4 mm de diámetro, cuya coloración varía de marrón a marrón oscuro.

Desmodium (*Desmodium heterocarpon*)

Desmodium heterocarpon es una especie ampliamente utilizada como cobertura en cultivos de palma de aceite. Se caracteriza por presentar un crecimiento semiarbustivo, con hábito ascendente o rastrero. Sus hojas son trifoliadas, con foliolos ovalados, de superficie lisa en el haz y con vellosidades finas en el envés (Figura 5). Además, posee la capacidad de desarrollar raíces adventicias a partir de los tallos postrados que tienen contacto con el suelo, lo que favorece su propagación vegetativa.

Los tallos maduros presentan una coloración marrón y consistencia leñosa, y pueden ser lisos o estar cubiertos por vellosidades blanquecinas. La especie produce inflorescencias en racimos terminales y axilares, conformadas por numerosas flores de tonalidad violácea, más oscura en la parte interna y más clara en la externa (Figura 5). Sus vainas son erectas, oblongas y dehiscentes, y contienen entre 4 y 8 semillas semielípticas de aproximadamente 2,5 mm de diámetro, cuya coloración varía entre amarillo y naranja.



Figura 5. Aspecto de las flores y el follaje de desmodium (*Desmodium heterocarpon*).

Mucuna (*Mucuna bracteata*)

Es una especie voluble cuyo uso se ha implementado exitosamente en plantaciones de palma de aceite en Malasia. Es una planta herbácea de rápido crecimiento y de comportamiento altamente agresivo, propiedad que le confiere una elevada capacidad competitiva frente a las malezas.

Sus hojas son trifoliadas, grandes y de color verde oscuro, con foliolos que oscilan entre 7 y 15 cm de longitud (Figura 6); además, evidencian movimientos de apertura y cierre en respuesta a variaciones de la temperatura ambiental, fenómeno conocido como termonastia.

Debido a su hábito de crecimiento rastrero, esta especie desarrolla abundantes raíces adventicias a partir de los nudos de los tallos.



Figura 6. Aspecto del follaje de mucuna (*Mucuna bracteata*).

Disponibilidad y uso de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas

En el mercado existe una amplia variedad de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas. Sin embargo, estos productos, por lo general, no son especializados para las leguminosas de cobertura empleadas en las plantaciones de palma de aceite, sino para otros cultivos, como la soya y el frijol.

En la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma, se han realizado evaluaciones con estos biofertilizantes comerciales en diferentes leguminosas de cobertura y se han obtenido resultados favorables en comparación con la no inoculación de las semillas.

Los biofertilizantes disponibles en el mercado son elaborados a base de *Bradyrhizobium* sp. o *Rhizobium* sp., o una mezcla de especies de estos dos géneros, los cuales favorecen el establecimiento de relaciones simbióticas eficientes con las leguminosas.

2. Evaluación de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno

¿Por qué evaluar los biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas de cobertura?

Para que ocurra la fijación biológica de nitrógeno es fundamental que se establezca una simbiosis efectiva entre las leguminosas de cobertura y las bacterias presentes en los biofertilizantes. El éxito de este proceso depende, en gran medida, de la afinidad entre las cepas bacterianas y la planta hospedera, la cual está influenciada por factores fisiológicos y bioquímicos.

Dado este escenario, es altamente recomendable evaluar previamente este tipo de bioinsumos, para verificar su efectividad y compatibilidad con las especies de leguminosas empleadas como cobertura vegetal en plantaciones de palma de aceite. Esto permite asegurar un adecuado establecimiento de la simbiosis y un mayor aporte de nitrógeno al sistema.

Alistamiento de semillas de leguminosas

La evaluación de biofertilizantes a base de BFNS requiere trabajar con semillas de leguminosas en buen estado. Para ello, es necesario seguir los pasos descritos a continuación:

1. Selección de semillas viables

Es necesario realizar pruebas que permitan identificar las semillas viables y las no viables, mediante las siguientes metodologías:

Método de flotación: consiste en colocar las semillas en un recipiente con agua limpia. Aquellas semillas que floten deben descartarse, ya que las que permanecen en el fondo presentan mayor densidad debido a un buen desarrollo del embrión. Por el contrario, las semillas que flotan tienen una menor densidad, asociada al deterioro o desarrollo deficiente del embrión (Figura 7) (Silva *et al.*, 2021).



Figura 7. Selección de semillas por el método de flotación.

Método de tinción de cloruro de tetrazolio: se recomienda para leguminosas de semillas grandes, como *Mucuna* sp. (Figura 8) (Acosta Fernández *et al.*, 2021; Stein *et al.*, 1986). El procedimiento consiste en los siguientes pasos:

- **Hidratación previa:** sumergir en agua entre 50 y 100 semillas durante 18 a 24 horas, para ablandar la cubierta y facilitar el corte.
- **Preparación:** realizar cuidadosamente un corte en cada semilla para dejar expuesto el embrión sin dañarlo.
- **Tinción:** sumergir las semillas en una solución de cloruro de tetrazolio al 0,5%-1% (pH 6,5-7,5).
- **Incubación:** mantener la muestra a una temperatura entre 30 y 40 °C durante 4-6 horas en oscuridad.

Interpretación de prueba de viabilidad

- **Semillas viables:** es posible identificarlas por presentar una tinción roja intensa y uniforme en la totalidad de sus tejidos (Figura 9a), lo que evidencia una adecuada actividad enzimática y la integridad fisiológica de la semilla. Asimismo, los cotiledones y el eje embrionario deberán observarse completamente coloreados, ya que esto indica que la totalidad de sus tejidos se encuentra metabólicamente activa. Este patrón de tinción se considera un indicador confiable de viabilidad, porque refleja el correcto funcionamiento celular y el potencial de germinación de la semilla.
- **Semillas con viabilidad parcial:** presentan una combinación de áreas rojas y otras blancas o marrones, por lo que se clasifican como semillas de vigor reducido o de viabilidad parcial. El tejido rojo indica actividad enzimática y vida celular, mientras que las

zonas sin coloración o de tonalidad marrón evidencian tejidos deteriorados, muertos o con baja actividad metabólica (Figura 9b). La viabilidad dependerá de la localización y la extensión del daño, especialmente cuando este comprometa el eje embrionario o estructuras esenciales para la germinación.

- **Semillas no viables:** se reconocen por la ausencia de tinción en diferentes regiones del tejido, lo que indica una baja actividad metabólica o la presencia de tejidos muertos. Asimismo, estas semillas pueden presentar una coloración café o beige uniforme, asociada a la falta de reducción del cloruro de tetrazolio (TZ), lo que evidencia la ausencia total de actividad enzimática (Figura 9c). La falta de coloración roja en los cotiledones y el eje embrionario refleja un deterioro fisiológico y la pérdida de viabilidad de la semilla, lo que significa que no posee la capacidad necesaria para germinar y desarrollarse normalmente.

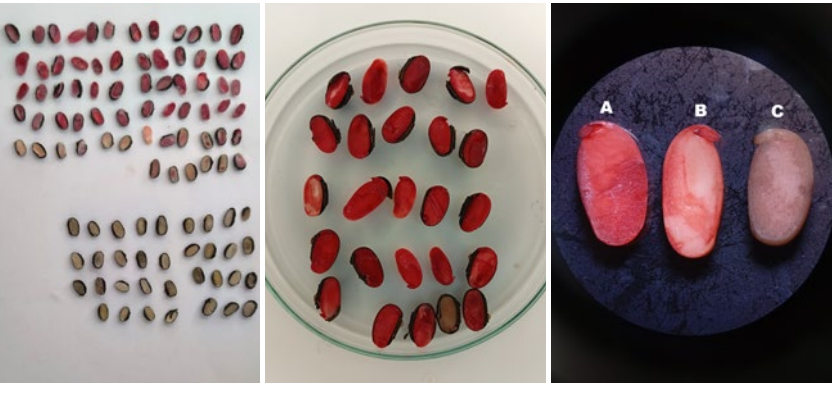


Figura 9. Semillas de *Mucuna* sp. teñidas con cloruro de tetrazolio: a) semilla viable; b) semilla con evidencia de daño; c) semilla no viable.

Para calcular el porcentaje de viabilidad de las semillas se debe emplear la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{Número de semillas viables}}{\text{Número de semillas evaluadas}} \times 100$$

2. Desinfección

Es el proceso mediante el cual se eliminan o reducen los microorganismos patógenos presentes en la superficie de las semillas, con el objetivo de prevenir enfermedades durante la germinación y el desarrollo inicial de la planta (Maiquetía *et al.*, 2020). Para realizar adecuadamente este procedimiento es necesario seguir los pasos descritos a continuación:

- Lavar las semillas tres veces con jabón líquido de cocina y enjuagarlas con agua limpia.
- Sumergir las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos.
- Enjuagar las semillas con agua limpia, preferiblemente destilada o estéril, al menos cinco veces para retirar los residuos del desinfectante.

3. Escarificación

Es el proceso empleado para romper o debilitar la cubierta dura de la semilla con el fin de permitir la entrada de agua y oxígeno, de manera que facilite la germinación. Para ello, se pueden emplear los siguientes métodos:

- **Método con agua caliente:** consiste en introducir las semillas en bolsas de tela y sumergirlas en agua caliente durante el tiempo necesario según la especie de leguminosa (Tabla 1). Posteriormente, se dejan reposar sobre paños absorbentes hasta que se sequen.

Tabla 1. Temperatura y tiempo de exposición en agua caliente para escarificación de semillas de *Pueraria phaseoloides* (kudzu) y *Desmodium heterocarpon*.

Leguminosa	Temperatura y tiempo
Pueraria phaseoloides	70 a 80 °C de 1 a 5 minutos
Desmodium heterocarpon	70 a 80 °C de 10 a 15 minutos

- **Mecánica:** este proceso, utilizado generalmente en semillas grandes y de cubierta gruesa, como *Mucuna* sp., consiste en retirar una pequeña porción de la cubierta en los polos de la semilla (Figura 10), lo cual facilita el proceso de germinación del embrión (Gutiérrez *et al.*, 2012).



Figura 10. a) Proceso de escarificación mecánica de *Mucuna bracteata* realizada con cortaúñas; b) semilla escarificada sin afectar endospermo; c) semillas escarificadas.

Nota: cuando las semillas de leguminosas comercializadas han tenido tratamiento fungicida, no debe realizarse ningún proceso adicional de desinfección. No obstante, durante su manipulación es obligatorio el uso de elementos de protección personal, como guantes y cubrebocas, con el fin de prevenir riesgos y proteger la salud del manipulador.

4. Germinación

Es el proceso mediante el cual una semilla inicia su desarrollo y da origen a una plántula, generalmente marcado por la emergencia de la radícula. Esto sucede cuando las condiciones de humedad, temperatura y oxígeno son adecuadas (Aguilar Benítez *et al.*, 2019) (Figura 11).

Para evaluar biofertilizantes a base de BFNS en leguminosas es importante contar con semillas que presenten un porcentaje de germinación igual o mayor al 75%. Por lo tanto, para determinar el porcentaje real de germinación es necesario realizar correctamente el proceso de escarificación descrito en el numeral 3.

Una prueba de germinación se realiza mediante los siguientes pasos:

- Realizar la escarificación de las semillas según el método correspondiente.
- Colocar papel absorbente humedecido como sustrato en recipientes adecuados.
- Distribuir uniformemente las semillas sobre el sustrato, de manera que no haya contacto excesivo entre ellas (cuatro repeticiones de al menos 25 semillas cada una).
- Mantener una temperatura de 25 a 30 °C, preferiblemente durante el tiempo requerido por cada leguminosa (Tabla 2).
- Contar las semillas germinadas.

Tabla 2. Duración de la prueba de germinación para escarificación de *Pueraria phaseoloides* (kudzu), *Mucuna bracteata* y *Desmodium heterocarpon*.

Leguminosa	Tiempo de prueba (días)
Pueraria phaseoloides	7-10
Mucuna bracteata	8-12
Desmodium heterocarpon	10-14

Para calcular el porcentaje de germinación se debe aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de germinación (\%)} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas evaluadas}} \times 100$$

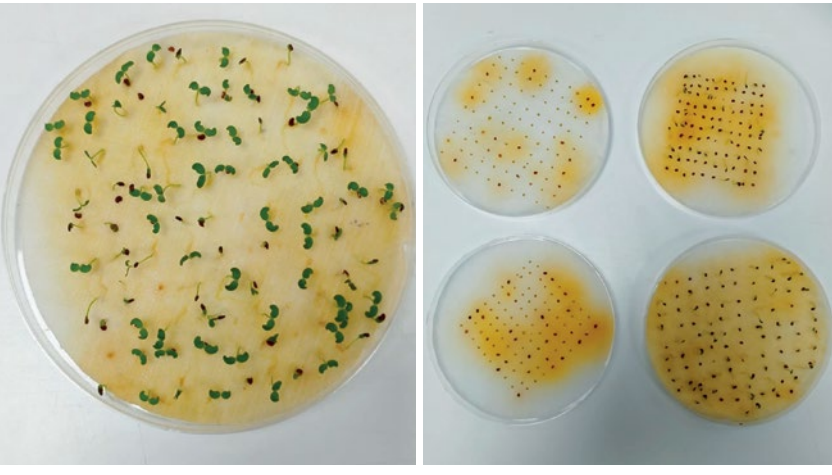


Figura 11. Ejemplo de montaje de prueba de germinación para *Desmodium heterocarpon*: a) montaje de semillas en el día 1; b) montaje del día 10 con un porcentaje de germinación del 83,3%.

Control de calidad de biofertilizantes

Hace referencia a la evaluación de los parámetros de calidad de los biofertilizantes, con énfasis en la viabilidad de los microorganismos y la presencia de contaminación microbiológica (Ospino Ballesteros *et al.*, 2026). Para esto se requieren los materiales relacionados a continuación:

Materiales

- Balanza con capacidad mínima de 10 g (Figura 12).
- Incubadora para cultivos microbiológicos (Figura 13).
- Micropipetas o pipetas de vidrio con capacidad para dispensar 100 µL.
- Puntas estériles para pipeta.
- Frascos bacteriológicos con solución salina estéril al 0,85%.
- Cajas de Petri con medio de cultivo agar YEM (*Yeast Extract Mannitol*), para evaluar bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas (BFNS).

  Fórmula (g L-1): extracto de levadura (1,0 g), manitol (10,0 g), fosfato dipotásico (0,5 g), sulfato de magnesio (0,2 g), cloruro de sodio (0,1 g), rojo Congo (0,025 g) y agar (20,0 g). El pH final del medio debe ser 6,8 ± 0,2, determinado a 25 °C.
- Cajas de Petri con medio de cultivo agar Sabouraud o agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) para evaluar hongos y levaduras contaminantes.

  Fórmula del agar Sabouraud (g L-1): peptona de caseína (5 g), peptona de carne (5 g), D(+)-glucosa o dextrosa (40 g) y agar-agar (15 g). El pH final del medio debe ser 5,4 ± 5,8 a 25 °C.

Fórmula del agar PDA (g L-1): infusión papa fresca (200 g), dextrosa (20 g) y agar (15 g). El pH final del medio debe ser 5,6 ± 0,2 a 25 °C.



Figura 12. Balanza para el pesaje de muestras.



Figura 13. Incubadora para cultivos microbiológicos.

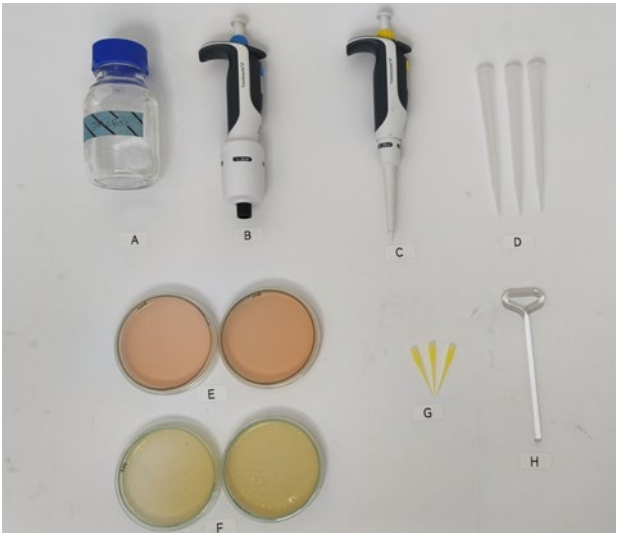


Figura 14. Materiales de laboratorio para el control de calidad de biofertilizantes: a) solución salina al 0,85%; b) transferpipeta de 10 mL; c) micropipeta de 100 µL; d) puntas para transferpipeta; e) agar YEM (*Yeast Extract Mannitol*); f) agar Sabouraud; g) Puntas de micropipeta de µL 100 h) asa de Drigalski.

Para evaluar estos dos parámetros (viabilidad de los microorganismos y presencia de contaminación microbiológica) es necesario someter los biofertilizantes a pruebas microbiológicas. El método más recomendado es el recuento en placa, para lo cual se deben realizar los siguientes pasos:

- **Diluciones seriadas 1:10:** añadir 10 gramos del biofertilizante a 90 mL de diluyente (se recomienda utilizar solución salina al 0,85%), realizando diluciones seriadas hasta obtener la dilución adecuada para el recuento de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Figura 15).

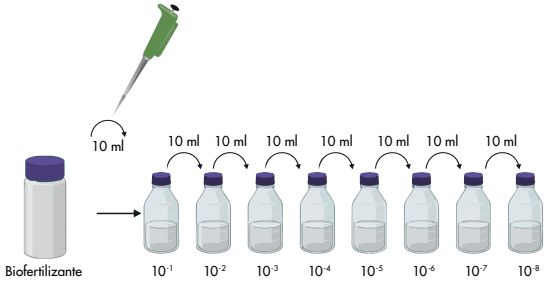


Figura 15. Proceso de dilución de muestras de biofertilizante a base de BFNS en solución salina al 0,85%.

- **Siembra en medios de cultivo:** con ayuda de una micropipeta o una pipeta de vidrio estéril, tomar 100 µL de cada una de las diluciones seleccionadas y realizar la siembra en superficie en los medios de cultivo correspondientes. Para evaluar la viabilidad de las BFNS, utilizar agar YEM (*Yeast Extract Mannitol*), y para evaluar hongos filamentosos y levaduras, emplear agar Sabouraud o agar papa dextrosa. Se recomienda sembrar dilución baja (10^{-3}), intermedia (10^{-5}) y alta (10^{-8}) (Ospino Ballesteros *et al.*, 2026) (Figura 16).

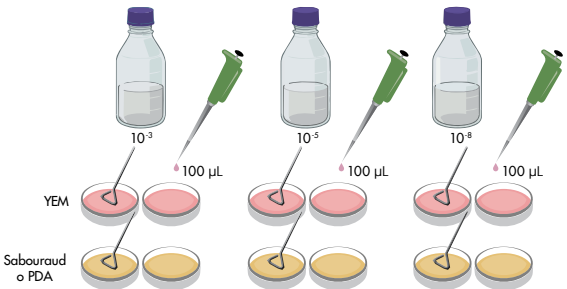


Figura 16. Siembra en superficie para el recuento de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas en medio de cultivo YEM y recuentos de hongos filamentosos y levaduras contaminantes en agar Sabouraud o agar papa dextrosa (PDA).

- **Incubación:** incubar los medios para las BFNS durante 3 a 10 días a una temperatura de 30 a 35 °C. Para el recuento de hongos filamentosos y levaduras contaminantes, incubar las cajas con agar Sabouraud o agar papa dextrosa (PDA) durante 5 a 7 días a una temperatura de 20 a 25 °C. Las cajas para hongos contaminantes pueden ser incubadas a temperatura ambiente en una zona limpia del laboratorio.
- **Conteo de colonias:** para obtener el valor de unidades formadoras de colonias (UFC) viables se debe realizar el recuento de las colonias características de las BFNS (Tabla 3) y multiplicar el resultado por el factor de dilución correspondiente. De igual manera, para determinar las UFC de contaminantes es necesario efectuar el recuento total de hongos y levaduras.

La siguiente ecuación permite hacer este cálculo:

$$\text{UFC mL}^{-1} = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{Volumen sembrado (mL)}} \times \text{F. dilución}$$

Ejemplo:

Biofertilizante líquido declarado como *Bradyrhizobium japonicum* 1×10^9 UFC mL^{-1}. Se realizó una dilución seriada hasta 10^8 y una siembra en superficie (0,1 mL/placa) en medio YEM. El mejor recuento se obtuvo en la dilución 10^5 con un promedio de 71 UFC/ mL^{-1}.

a. $\text{UFC mL}^{-1} = \frac{71}{0{,}1\ (\text{mL})} \times 10^5$

b. $\frac{71}{0{,}1} \times 710$

c. $710 \times 10^5 = 7{,}1 \times 10^7$ UFC/mL

Tabla 3. Colonias características de *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. en medio de cultivo LMA.

Característica	*Rhizobium* sp.	*Bradyrhizobium* sp.
Forma y tamaño	Colonias circulares, convexas, de bordes regulares y tamaño mediano	Colonias circulares, de menor tamaño y menos elevadas
Color	Blanco cremoso, ligeramente translúcido	Blanco opaco a crema
Textura	Suave y mucosa (por producción de exopolisacáridos)	Seca sin producción de mucosa
Tiempo de crecimiento	Rápido (3-5 días)	Lento (7-10 días)

Inoculación de semillas de leguminosas con biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno

La inoculación consiste en la aplicación controlada de bacterias simbióticas sobre la superficie de las semillas (Figura 17). Para llevar a cabo este procedimiento se recomienda realizar los siguientes pasos:

- Desinfectar las semillas.
- Escarificarlas de acuerdo con el tipo de semilla.
- Adicionar el biofertilizante a base de BFNS. Para ello, poner las semillas en un recipiente limpio y agregar el biofertilizante. La cantidad empleada dependerá de las indicaciones del fabricante y puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$\text{Cantidad de biofertilizante requerida} = \frac{\text{Cantidad de semillas para evaluar x volumen especificado}}{\text{Cantidad de semilla especificada}}$$

Ejemplo:

Si un biofertilizante a base de *Bradyrhizobium* sp., con una concentración de 1 x 10^8 UFC mL^{-1}, especifica que se requieren 2 litros de producto para 60 kg de semillas, ¿cuánto biofertilizante debe emplearse para inocular 1 kg de semillas?

$$\text{Cantidad de biofertilizante requerida} = \frac{\text{1 kg de semillas x 2 L de producto especificado}}{\text{60 kg de semilla especificada}}$$

$$mL = 0{,}03\ L \times 1.000 = 30\ mL$$

- Una vez adicionado el biofertilizante a las semillas, se debe agitar el recipiente hasta observar que estas queden uniformemente impregnadas por el producto. Posteriormente, dejar actuar por lo menos durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, retirar las semillas del recipiente y extenderlas sobre un paño limpio para dejarlas secar por 120 minutos como mínimo. Finalmente, proceder con la siembra.



Figura 17. Proceso de inoculación de semillas de *Mucuna bracteata*.

Diseño de la prueba de campo

Para evaluar la eficacia de los biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas (BFNS) es necesario establecer un diseño experimental adecuado. Como mínimo, este debe incluir un tratamiento testigo, consistente en la siembra de leguminosas sin inoculación en bolsas de vivero, y uno o más tratamientos adicionales en los que se aplique el biofertilizante objeto de evaluación (Tabla 4).

Con el fin de garantizar el adecuado desarrollo de las leguminosas durante el ensayo, el riego en vivero deberá ajustarse de acuerdo con el requerimiento hídrico de cada especie (Tabla 5).

Tabla 4. Diseño experimental para evaluación de biofertilizantes en leguminosas de cobertura.

Tratamiento	Leguminosa evaluada	Biofertilizante	Repeticiones	Unidades experimentales	Total
T1	Especie por evaluar	Testigo (sin inoculación)	4	8	32
T2	Especie por evaluar	*Rhizobium* sp.	4	8	32

Tabla 5. Requerimiento hídrico de las leguminosas de cobertura empleadas en el cultivo de la palma de aceite.

Leguminosa	Requerimiento hídrico
Pueraria phaseoloides	Evapotranspiración: 3,2 mm/día (rango: 1,2-4,8 mm/día)
Mucuna bracteata	Precipitación: ≥ 1.000 mm/año (≈ 40 pulgadas de lluvia)
Desmodium heterocarpon	Evapotranspiración: 3,2 mm/día



Figura 18. Ejemplo de montaje de vivero para la evaluación de biofertilizantes con fines de investigación.

La duración del ensayo dependerá de la fisiología de cada especie. En consecuencia, el experimento se dará por finalizado cuando las plantas produzcan la tercera hoja trifoliada (estado vegetativo V3).

Tabla 6. Duración de la evaluación para cada leguminosa de cobertura.

Leguminosa	Tiempo de destructivo (días)
Pueraria phaseoloides	60
Mucuna bracteata	45
Desmodium heterocarpon	60

Variables de seguimiento

En este tipo de ensayos (evaluación de biofertilizantes con bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas), una variable de seguimiento corresponde a cualquier característica que se mide periódicamente para evaluar el efecto de los tratamientos a lo largo del tiempo.

Las variables por evaluar son:

- **Número de nódulos según la profundidad de la raíz (0-5 cm y > 5 cm)**

  Consiste en realizar el recuento de los nódulos presentes en las raíces de las leguminosas. Para ello, se debe diferenciar entre los nódulos ubicados desde la base del tallo hasta los primeros 5 cm (0-5 cm) de la raíz y los localizados desde los 5 cm de profundidad hasta la máxima elongación de la raíz (> 5 cm).

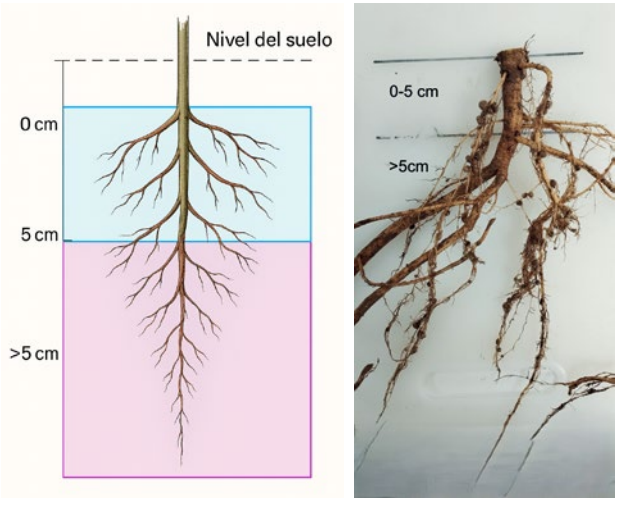


Figura 19. Evaluación del número de nódulos según la profundidad de la raíz: a) escala de evaluación; b) raíz de *Pueraria phaseoloides*, con la delimitación de las zonas de evaluación comprendidas entre 0 y 5 cm, y más de 5 cm hasta la máxima elongación de la raíz.

- **Número total de nódulos**

  Corresponde a la sumatoria de los nódulos localizados entre 0 y 5 cm desde la base del tallo y la raíz, y de aquellos ubicados a más de 5 cm en cada planta. Posteriormente, el promedio obtenido para cada tratamiento se clasifica según las categorías presentadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Categorías para la evaluación del número total de nódulos (tabla adaptada del Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT], 1988).

Número de nódulos	Evaluación
≥ 100	Muy abundante
50-99	Abundante
10-49	Mediana
1-9	Poca
0	Nula

- **Color de los nódulos**

  Para evaluar esta variable se debe seleccionar el 10% de los nódulos obtenidos en cada planta del tratamiento, con el fin de inspeccionar y clasificar su coloración. Esta evaluación aplica para leguminosas con nodulación medianamente abundante o superior. En el caso de leguminosas con poca nodulación se recomienda evaluar al menos un nódulo.

  La clasificación de la coloración de los nódulos se realiza de acuerdo con la Tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de los nódulos según su coloración (tabla adaptada del CIAT (1988)).

Color de los nódulos	Evaluación
Blanco	Inactivo
Negro	Senescente
Marrón	Senescente
Rosado	Activo
Rojo	Activo

- **Biomasa seca total**

  La biomasa seca aérea y radicular debe determinarse mediante la cosecha completa de las plantas al finalizar el experimento, para lo cual se debe separar cuidadosamente la parte aérea (tallos y hojas) del sistema radicular. Posteriormente, las raíces deben lavarse suavemente con agua para retirar por completo los residuos de suelo o sustrato adheridos, de manera que no haya pérdidas de tejido vegetal.

  Tanto la fracción aérea como la radicular deben colocarse por separado en bolsas de papel previamente identificadas y secarse en una estufa de aire forzado a 65-70 °C hasta alcanzar un peso constante.

  Finalmente, cada muestra debe pesarse en una balanza analítica o de precisión. Los valores correspondientes a biomasa seca aérea y biomasa seca radicular, expresados en gramos de materia seca por planta, deben registrarse por separado.

  La biomasa seca total de cada planta se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{Biomasa seca total (g)} = \text{Biomasa seca radicular (g)} + \text{Biomasa seca aérea (g)}$$

A continuación, para calcular la biomasa seca total promedio por tratamiento se emplea la siguiente ecuación:

$$\text{Biomasa seca total promedio} = \frac{\text{Sumatoria de biomasa seca total de cada planta (g)}}{\text{Número de plantas}}$$

- **Aporte de nitrógeno**

  Para determinar esta variable, previamente se debe enviar la biomasa seca aérea y la radicular a un laboratorio con capacidad para cuantificar el contenido de nitrógeno en material vegetal. Con los resultados obtenidos se pueden calcular las siguientes variables:

Nitrógeno en la biomasa

Corresponde al porcentaje de nitrógeno presente en la materia seca de la planta (hojas, tallos y raíces). Inicialmente, se calcula el contenido de nitrógeno por planta para cada tratamiento, mediante la sumatoria del nitrógeno determinado en la biomasa aérea y en la biomasa radicular.

Posteriormente, se calcula el nitrógeno total en la biomasa para cada tratamiento mediante la siguiente ecuación:

$$\text{N total en la biomasa (\%)} = \frac{\text{Sumatoria de N por planta}}{\text{Número de plantas por tratamiento}}$$

Nitrógeno acumulado

Corresponde a la cantidad total de nitrógeno acumulada por planta o por área. Esta variable considera la biomasa producida y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{N acumulado} \left(\frac{\text{g}}{\text{planta}} \right) = \frac{\text{Peso seco total de biomasa (g)} \times \text{\% N}}{100}$$

Las variables de seguimiento descritas anteriormente están basadas en el *Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico* del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Selección de biofertilizantes

La selección del biofertilizante se realiza con base en los resultados obtenidos en las evaluaciones de vivero. Un biofertilizante se considera efectivo cuando supera al tratamiento testigo (sin inoculación) en un rango del 15 al 20% para las variables evaluadas.

Cuando se comparan varios biofertilizantes, se selecciona aquel que presente el mejor desempeño con respecto al tratamiento testigo.

Esta evaluación también permite establecer si un mismo biofertilizante mantiene un desempeño satisfactorio en todas las leguminosas evaluadas o si se requiere un producto específico para cada especie.

Glosario

- **Agar YEM (*Yeast Extract Mannitol*):** medio de cultivo sólido, selectivo y diferencial, ampliamente utilizado para el aislamiento, el crecimiento y la caracterización de bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y otros rizobios.
- **Agar Sabouraud/agar papa dextrosa:** medios de cultivo diseñados principalmente para el aislamiento, el crecimiento y el mantenimiento de hongos filamentosos y levaduras.
- **Alistamiento de semillas:** conjunto de procesos de selección, desinfección y escarificación realizados antes de la siembra.
- **Análisis de germinación:** prueba que determina el porcentaje de semillas que germinan.
- **Aporte de nitrógeno:** cantidad total de nitrógeno incorporado en la biomasa de la planta.
- **BFNS:** sigla de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas que forman nódulos en las raíces de las leguminosas.
- **Biofertilizantes:** bioinsumos cuyo principio activo son microorganismos benéficos que contribuyen a mejorar la nutrición vegetal.
- **Biomasa seca total:** peso seco total de la biomasa aérea y radicular de la planta.
- **Cloruro de tetrazolio:** reactivo usado para pruebas de viabilidad de semillas.

- **Color de nódulos:** criterio utilizado para evaluar la actividad de la simbiosis según la coloración interna de los nódulos.
- **Contaminación microbiológica:** presencia de microorganismos no deseados en biofertilizantes.
- **Desinfección de semillas:** proceso de eliminación de microorganismos presentes en la superficie de las semillas mediante aplicación de sustancias desinfectantes.
- **Diluciones seriadas:** técnica de reducción progresiva de la concentración de una muestra para facilitar el recuento microbiológico.
- **Escarificación:** proceso de ruptura o ablandamiento de la cubierta de la semilla para inducir la germinación.
- **FBN:** siglas de fijación biológica de nitrógeno.
- **Flotación:** método para identificar semillas viables mediante su inmersión en agua.
- **Germinación:** proceso en el que la semilla inicia su desarrollo y emerge la radícula.
- **Inoculación:** aplicación de biofertilizantes sobre las semillas antes de la siembra.
- **Leguminosas de cobertura:** especies de la familia Fabaceae que se siembran principalmente para proteger, mejorar y mantener la calidad del suelo.
- **Nitrógeno en biomasa:** porcentaje de nitrógeno presente en la biomasa seca de una planta.
- **Nódulos:** estructuras que se forman en las raíces de las leguminosas de cobertura como resultado de la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno; en ellas ocurre la fijación biológica de nitrógeno.

- **Recuento en placa:** método microbiológico para cuantificar unidades formadoras de colonias (UFC).
- **Requerimiento hídrico:** cantidad de agua necesaria para el adecuado crecimiento y desarrollo de cada leguminosa.
- **Simbiosis:** asociación mutuamente beneficiosa entre leguminosas y bacterias.
- **UFC:** sigla de unidades formadoras de colonias, que indican la cantidad de bacterias viables presentes en una muestra.

Anexo

Condiciones de almacenamiento de biofertilizantes

La mayoría de los fabricantes de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas (BFNS) recomiendan almacenar estos bioinsumos a temperatura ambiente. Sin embargo, en las plantaciones de palma de aceite, las bodegas de almacenamiento suelen alcanzar temperaturas elevadas durante el día, lo que podría afectar la viabilidad de los microorganismos presentes en el producto.

La exposición prolongada a temperatura entre 30 y 40 °C puede favorecer la multiplicación descontrolada de los microorganismos presentes en la formulación o, por el contrario, ocasionar su degradación celular. Adicionalmente, las inadecuadas prácticas de asepsia en las áreas de almacenamiento pueden incrementar el riesgo de contaminación del producto.

Estudios previos realizados por Cenipalma han evidenciado que, para minimizar el riesgo de contaminación y preservar la viabilidad de los microorganismos, se recomienda almacenar los biofertilizantes en refrigeración, entre 2 y 8 °C, o en recintos con temperatura constante de hasta 22 °C, en adecuadas condiciones de limpieza.



Figura 20. Condiciones de almacenamiento de biofertilizantes recomendadas para plantaciones de palma de aceite.

Referencias bibliográficas

Acosta Fernández, Y., Fontes Marrero, D., & Martínez Montero, M. E. (2021). Liquid Nitrogen as promotor of seeds germination and seedling growth in tropical legumes. *Inge Cuc, 17*(2). https://doi.org/10.17981/ingecuc.17.2.2021.01

Aguilar Benítez, G., Vázquez Díaz, E. G., Castro Rivera, R., Cruz Crespo, E., & Jarquin Gálvez, R. (2019). Germinación de cultivares de frijol con características físicas contrastantes bajo condiciones de estrés osmótico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 10*(2), 239–251. https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.720

Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1988). Simbiosis Leguminosa-Rizobio: manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Sección Microbiología de suelos, programa de pastos tropicales y programa de fríjol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Gutiérrez, M. I., Miranda, D., & Cárdenas-Hernández, J. F. (2012). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 5*(2), 209–219. https://doi.org/10.17584/rcch.2011v5i2.1268

Maiquetía, M., Vargas, E. T., Toro García, M., & García de García, E. C. (2020). Estudios en la germinación y propagación *in vitro* de tres especies de Leguminosae: *Calopogonium* sp.,*Stylosantes capitata* y *Cassia moschata*. *Revista Científica Ecociencia, 7*(6). https://doi.org/10.21855/ecociencia.76.393

Ospino Ballesteros, M. R., Teherán Sierra, L. G., & Arias Arias, N. A. (2026). Recuento en placa como método para evaluar la viabilidad de bacterias fijadoras de nitrógeno simbiontes en biofertilizantes. *Palmas, 46*(4), *7*–14. https://doi.org/10.56866/01212923.14503

Silva, R. C., Castrillon, S. K. I., Castrillon Fernandez, J. R., de Morais, F. F., Tavares Morini, A. A. E., & da Silva Nunes, J. R. (2021). Overcoming dormancy in seeds of *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (Leguminosae, Papilionoideae). *Research, Society and Development, 10*(1). https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.9144

Stein, W. I., Danielson, R., Shaw, N., Wolff, S., & Gerdes, D. (1986). *Users Guide for Seeds of Western Trees and Shrubs*. United States Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.

Esta publicación es propiedad del Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma, por tanto, ninguna parte del material ni su contenido, ni ninguna copia del mismo puede ser alterada en forma alguna, transmitida, copiada o distribuida a terceros sin el consentimiento expreso de Cenipalma. Al realizar la presente publicación, Cenipalma ha confiado en la información proveniente de fuentes públicas o fuentes debidamente publicadas. Contiene recomendaciones o sugerencias que profesionalmente resultan adecuadas e idóneas con base en el estado actual de la técnica, los estudios científicos, así como las investigaciones propias adelantadas. A menos que esté expresamente indicado, no se ha utilizado en esta publicación información sujeta a confidencialidad ni información privilegiada o aquella que pueda significar incumplimiento a la legislación sobre derechos de autor. La información contenida en esta publicación es de carácter estrictamente referencial y así debe ser tomada y está ajustada a las normas nacionales de competencia, Código de Ética y Buen Gobierno de la Federación, respetando en todo momento la libre participación de las empresas en el mercado, el bienestar de los consumidores y la eficiencia económica.



palmeros en acción
Rumbo a las 5 toneladas

Escucha el pódcast de la palmicultura colombiana en:

YouTube

Spotify

CenipalmaOrg Cenipalma CenipalmaCo

CenipalmaOrg CenipalmaOrg

www.cenipalma.org