Green World Journal
ISSN: 2737-6109

CaMeRa Editorial

RESEARCH ARTICLE

Caracterización fisicoquímica, microbiológica y molecular de biofertilizantes de fermentación aeróbica y anaeróbica de origen ruminal bovino

Luis Alejandro Bautista Palma [1] Digna Jael Nivela Andrade [1] Nurys Mabel Palma Ponce [2] Isaac Isidro Freile Mera [1] Maira Elizabeth Freile Mera [1] Cristobal Gerardo Manzaba López [1]

[1] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Posgrado, Quevedo, Los Ríos, Ecuador

[2] Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guayaquil, Guayas, Ecuador

Correspondencia: luis.bautista1003@gmail.com + 593 93 991 3097

DOI/URL: https://doi.org/10.53313/gwj93357

Resumen: Los biofertilizantes líquidos elaborados a partir de contenido ruminal bovino constituyen una alternativa sostenible a los fertilizantes químicos; sin embargo, su composición fisicoquímica, diversidad microbiana y perfil molecular han sido poco caracterizados. El objetivo fue caracterizar fisicoquímica, microbiológica y molecularmente biofertilizantes de fermentación aeróbica (cosecha a los 30 días) y anaeróbica (cosecha a los 60 días) de origen ruminal bovino. Se aplicó un diseño no experimental, descriptivo y transversal con dos tratamientos, desarrollado en el Laboratorio de Biología y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Ecuador). Se determinaron temperatura, pH, conductividad eléctrica, macronutrientes, micronutrientes y metales pesados; las bacterias se aislaron en medios selectivos, se caracterizaron por morfología colonial, tinción de Gram y pruebas de catalasa y oxidasa, y se identificaron mediante secuenciación Sanger del gen ARNr 16S y comparación con GenBank. Los biofertilizantes anaeróbico y aeróbico presentaron pH ácido (4.6 y 5.5), conductividad eléctrica de 4.92 y 4.31 dS m^{-1}, nitrógeno de 1.0 % y 0.81 % y hierro de 96 y 95 ppm; el cadmio (0.02 mg kg^{-1}) y el plomo (0.5 mg kg^{-1}) se detectaron en bajas concentraciones. Se aislaron diez cepas, todas catalasa positivas, identificadas con 98.88–100 % de identidad como *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas veronii*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *Rhizobium leguminosarum*. Los biofermentos ruminales aeróbico y anaeróbico mostraron características fisicoquímicas similares y una diversidad bacteriana con potencial biotecnológico para la agricultura sostenible.

Palabras claves: biofertilizantes; contenido ruminal; fermentación aeróbica y anaeróbica; conductividad eléctrica; gen ARNr 16S; diversidad bacteriana.

Check for updates

Cita: Bautista Palma, L.A., Nivela Andrade D.J., Palma Ponce N.M., Freile Mera I.I., Freile Mera M.E & Manzaba López, C.G. (2026). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y molecular de biofertilizantes de fermentación aeróbica y anaeróbica de origen ruminal bovino. Green World Journal, 09(03), 357. https://doi.org/10.53313/gwj93357

Received: 30/septiembre /2026
Accepted: 15/noviembre/2026
Published: 16/ noviembre/ 2026

Prof. Carlos Mestanza-Ramón, PhD.
Editor-in-Chief / CaMeRa Editorial
editor@greenworldjournal.com

Editor's note: CaMeRa remains neutral with respect to legal claims resulting from published content. The responsibility for published information rests entirely with the authors.

© 2026 CaMeRa license, Green World Journal. This article is an open access document distributed under the terms and conditions of the license.
Creative Commons Attribution (CC BY).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Physicochemical, microbiological, and molecular characterization of biofertilizers from aerobic and anaerobic fermentation of bovine ruminal origin

Abstract: Liquid biofertilizers produced from bovine ruminal content are a sustainable alternative to chemical fertilizers; however, their physicochemical composition, microbial diversity, and molecular profile remain poorly characterized. The objective was to characterize, physicochemically, microbiologically, and molecularly, biofertilizers obtained from aerobic (harvested at 30 days) and anaerobic (harvested at 60 days) fermentation of bovine ruminal content. A non-experimental, descriptive, cross-sectional design with two treatments was applied at the Biology and Microbiology Laboratory of the Technical State University of Quevedo (Ecuador). Temperature, pH, electrical conductivity, macronutrients, micronutrients, and heavy metals were determined; bacteria were isolated on selective media, characterized by colony morphology, Gram staining, and catalase and oxidase tests, and identified by Sanger sequencing of the 16S rRNA gene and comparison with GenBank. The anaerobic and aerobic biofertilizers showed acidic pH (4.6 and 5.5), electrical conductivity of 4.92 and 4.31 dS m^{-1}, nitrogen of 1.0% and 0.81%, and iron of 96 and 95 ppm; cadmium (0.02 mg kg^{-1}) and lead (0.5 mg kg^{-1}) were detected at low concentrations. Ten strains were isolated, all catalase-positive, and identified with 98.88–100% identity as *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas veronii*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, and *Rhizobium leguminosarum*. Both aerobic and anaerobic ruminal bioferments showed similar physicochemical characteristics and a bacterial diversity with biotechnological potential for sustainable agriculture.

Keywords: biofertilizers; ruminal content; aerobic and anaerobic fermentation; electrical conductivity; 16S rRNA gene; bacterial diversity.

1. Introducción

La sostenibilidad agrícola es un desafío global y los biofertilizantes han emergido como una alternativa viable para mejorar la productividad sin comprometer el medio ambiente. Según datos recientes, el uso de biofertilizantes ha aumentado en un 9.05 % en comparación con los fertilizantes químicos tradicionales, lo que evidencia su creciente aceptación; sin embargo, persiste una falta de comprensión profunda de su composición fisicoquímica, de la diversidad microbiológica involucrada y de los procesos moleculares que influyen en su eficacia como fertilizantes agrícolas [1]. La agricultura orgánica se basa en una serie de transformaciones bioquímicas y microbiológicas que sufre la materia orgánica para el reciclado y aprovechamiento de los nutrientes, y uno de sus subprocesos es la obtención de abonos líquidos, como los bioles, los lixiviados de lombriz y los tés de compost [2].

Un biofertilizante es una sustancia que contiene organismos vivos que, al aplicarse a semillas, plantas o suelo, colonizan la rizosfera y promueven el crecimiento de las plantas hospedantes al aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes esenciales [2]. Los fertilizantes orgánicos pueden clasificarse según la fuente primaria de nutrientes que ingresa al suelo mediante la acción de microorganismos, en procesados y no tratados. Entre los reciclados se incluyen el compost, el lombricompost, el bocashi, los ácidos húmicos, los biofermentos y el té de estiércol, mientras que los crudos, como los residuos vegetales y el estiércol, se utilizan directamente [3]. Los biofermentos se elaboran con estiércol fresco y otros ingredientes orgánicos fermentados en un recipiente cerrado y generalmente se procesan en condiciones anaeróbicas, aunque también se utilizan procesos aeróbicos [2].

El biol es un abono de tipo foliar resultante de la digestión anaeróbica de restos de animales y vegetales; su producción busca incrementar la cantidad y la calidad de las cosechas y resulta fácil y económica porque emplea insumos locales [4]. Entre sus ventajas se mencionan la posibilidad de elaborarlo con los insumos de la comunidad, su bajo costo y la mejora del vigor del cultivo, que le permite soportar con mayor eficacia plagas, enfermedades y efectos adversos del clima [5]; entre

sus desventajas, el largo tiempo entre la preparación y la utilización [6]. En la fermentación, la presencia o la falta de oxígeno orienta la descomposición de la materia orgánica [7]: en el proceso anaeróbico los microorganismos descomponen la materia orgánica en ausencia de oxígeno molecular [8], mientras que en el aeróbico emplean el oxígeno para degradar los sustratos orgánicos y producir energía [9].

El análisis integral del biol abarca tres dimensiones: la caracterización fisicoquímica, que evalúa propiedades como el pH, la conductividad eléctrica, la presencia de nutrientes y la materia orgánica; la caracterización microbiológica, que describe la diversidad y funcionalidad de bacterias, hongos y actinomicetos, fundamentales para la salud del suelo y el ciclo de nutrientes; y la caracterización molecular, que permite identificar especies específicas y comprender su potencial metabólico [10]. El pH influye en la solubilidad y disponibilidad de los nutrientes y en el desarrollo de los microorganismos [11], y la conductividad eléctrica es una medida directa de la salinidad, cuyo exceso puede perjudicar a las plantas [12]. El biol aporta macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre) [13] y micronutrientes (hierro, manganeso, zinc, cobre y boro) [14], además de una alta actividad microbiana [15].

Entre las bacterias benéficas del suelo se citan los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Azotobacter*, *Acetobacter* y *Rhodococcus* [16], que pueden fijar nitrógeno, producir hormonas vegetales, proteger contra patógenos y mejorar la absorción de nutrientes, la resistencia a la sequía y la calidad del suelo [17]. Por ello, identificar correctamente los microorganismos es esencial cuando se emplean en un proceso [18]. La secuencia del gen ARNr 16S, de aproximadamente 1500 pb y con regiones variables y conservadas, constituye una de las formas más confiables de clasificar una bacteria en un grupo taxonómico; se amplifica por PCR con cebadores universales y se compara con bases de datos existentes [19,20]. La secuenciación de Sanger ha sido una herramienta clave en el análisis de la diversidad biológica y en la identificación de especies [21,22].

A pesar de este potencial, la falta de un conocimiento profundo sobre la composición fisicoquímica, la diversidad microbiológica y los procesos moleculares de los biofertilizantes derivados de la fermentación aeróbica y anaeróbica del material ruminal bovino limita su adopción masiva. La finalidad de esta investigación fue aprovechar de manera sostenible los desechos de cosecha y los insumos de la zona, así como el estiércol de animales cuya crianza es constante, para determinar los elementos bioquímicos necesarios para la nutrición vegetal presentes en dos tratamientos de fermentación. La hipótesis planteada fue que la caracterización fisicoquímica, microbiológica y molecular de los biofertilizantes derivados de la fermentación aeróbica y anaeróbica de material ruminal bovino revelaría una alta concentración de nutrientes y una diversidad microbiana específica. En consecuencia, el objetivo del estudio fue caracterizar fisicoquímica, microbiológica y molecularmente los biofertilizantes de fermentación aeróbica y anaeróbica de origen ruminal bovino, mediante la determinación de sus propiedades fisicoquímicas, la descripción de las comunidades bacterianas cultivables y su identificación molecular.

2. Materiales y métodos

2.1 Área de estudio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología y Microbiología del Campus Experimental La María de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en el kilómetro 7.5 de la vía Quevedo–El Empalme, recinto San Felipe, cantón Mocache, provincia de Los Ríos, Ecuador, con coordenadas geográficas 1°04′56″ S y 79°30′08″ O, a una altitud de 64 m s. n. m. El periodo experimental tuvo una duración de 60 días. La caracterización fisicoquímica se llevó a cabo en el Laboratorio de Agua

y Suelos de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en el kilómetro 5.5 de la vía Quevedo–El Empalme.

2.2 Métodos

2.2.1. Diseño de la investigación

Para las fases de identificación fisicoquímica, microbiológica y molecular de los biofertilizantes aeróbico y anaeróbico de origen ruminal se aplicó un diseño no experimental, con enfoque cualitativo de carácter descriptivo y un estudio de casos de corte transversal. Este diseño permitió observar y analizar las variables en su entorno natural, sin intervenir ni manipular las condiciones, y capturar una instantánea de las características estudiadas en el momento del análisis. Los dos tratamientos evaluados fueron el biofertilizante aeróbico y el biofertilizante anaeróbico. Los datos se analizaron de forma descriptiva.

2.2.2. Elaboración y cosecha de los biofertilizantes

Para preparar el biol se emplearon tanques de 60 L de capacidad, en los cuales se añadieron los insumos detallados en la Tabla 1; finalmente, el volumen del tanque se completó con agua hasta su capacidad máxima. La mezcla de leche, melaza, levadura y hojas de leguminosas aporta los carbohidratos y nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos [23]. Antes de iniciar la preparación se instalaron trampas de aire para garantizar que la fermentación anaeróbica se llevara a cabo de manera adecuada; para la fermentación aeróbica, el tanque se cubrió con una malla protectora. El biol aeróbico se cosechó a los 30 días y el biol anaeróbico a los 60 días. Ambos productos fueron filtrados con un embudo y una malla para asegurar su pureza.

Tabla 1. Insumos utilizados en la elaboración de cada biofertilizante (tanque de 60 L).

Insumo	Cantidad
Contenido ruminal bovino	10 kg
Melaza	3 kg
Hojas de leguminosas	2 kg
Mantillo de huerta	4 kg
Ceniza	1 kg
Levadura	0.5 kg
Leche fresca	2 L
Agua	hasta completar los 60 L

2.2.3. Caracterización fisicoquímica

Durante la recolección, el biofermento se homogenizó mediante agitación y se recolectó en recipientes estériles; para el transporte y almacenamiento hasta el laboratorio se mantuvo en condiciones herméticas y refrigeradas cuando no se analizó de inmediato. El color y el olor se determinaron por inspección visual y evaluación olfativa [24]. La caracterización química siguió las metodologías de la segunda edición del Manual de Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales [25]. Se determinaron la temperatura, el pH y la conductividad eléctrica; los macronutrientes nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S); los micronutrientes boro (B), zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) y manganeso (Mn); y los metales pesados cadmio (Cd) y plomo (Pb). Los métodos aplicados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Métodos aplicados para la caracterización fisicoquímica de los biofertilizantes [26,27].

Parámetro	Método	Norma ISO
pH	Potenciometría	—
Conductividad eléctrica	Conductimetría	—
Nitrógeno (N)	Kjeldahl	11261
Fósforo (P)	Fósforo reactivo	6878
Potasio (K)	Espectroscopía de absorción atómica	11047
Magnesio (Mg)	Espectroscopía de absorción atómica	11047
Azufre (S)	Azul de metileno	—
Cobre (Cu)	Espectroscopía de absorción atómica	11047
Hierro (Fe)	Espectroscopía de absorción atómica	11047
Manganeso (Mn)	Espectroscopía de absorción atómica	11047
Zinc (Zn)	Espectroscopía de absorción atómica	11047
Cadmio (Cd)	Espectroscopía de absorción atómica	11047
Plomo (Pb)	Espectroscopía de absorción atómica	11047

2.2.4. Caracterización microbiológica

Siembra y aislamiento. La siembra se realizó por el método de microgota. En tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL se añadieron 900 µL de agua destilada estéril y 100 µL del biofermento, y la mezcla se agitó en vórtex para asegurar una distribución uniforme. Se realizó una dilución seriada desde 10^{-1} hasta 10^{-6} y se sembró por duplicado en placas de Petri con medios selectivos para bacterias. Las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia durante 48 h a 37 °C. Las colonias seleccionadas se purificaron en tres ocasiones para obtener cultivos puros, que se reprodujeron en el mismo medio y se conservaron en refrigeración.

Análisis morfológico. Se cultivó una colonia bacteriana en medio sólido MRS, incubada durante 24 h a 31 °C. Tras el crecimiento se seleccionó una colonia representativa de cada muestra y se caracterizó según su forma (circular o irregular), bordes (ondulados o lisos), superficie (convexa), opacidad y color.

Prueba de catalasa. Se colocó una colonia bacteriana sobre un portaobjetos y se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %; la reacción se observó con un microscopio a 40× (Euromex, Ámsterdam, Países Bajos). La formación de burbujas indicó reacción positiva y su ausencia, reacción negativa.

Prueba de oxidasa. Se extendió una colonia bacteriana sobre un portaobjetos. El reactivo se preparó disolviendo tiras de papel impregnadas con para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida en presencia de citocromo c oxidasa, en 1000 µL de agua destilada estéril en un tubo Eppendorf. Tras agitar la mezcla y esperar 5 min, se aplicaron 10 µL sobre la bacteria y se realizó un frotis. El cambio de color a púrpura o azul oscuro indicó una prueba positiva.

Tinción de Gram. Los microorganismos se cultivaron en agar nutritivo, se inocularon por microgota y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Con una colonia se preparó un frotis, que se fijó con metanol; posteriormente se aplicó violeta de genciana durante 1 min, se enjuagó con agua destilada y se fijó con Lugol. Las muestras se lavaron con una mezcla de alcohol y acetona durante 1 min y se contrastaron con safranina o fucsina. Las bacterias Gram negativas se observaron de tono rosado o rojo y las Gram positivas retuvieron el color violeta.

2.2.5. Caracterización molecular

El ADN genómico se extrajo con el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, EE. UU.), siguiendo el protocolo del fabricante [28,29]. Se preparó una solución de PureLink® al 5 % en tampón TE (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8.0), que estabiliza el ADN durante el proceso de extracción. La identificación molecular se realizó mediante secuenciación (*barcoding*) del gen ARNr 16S a partir de cultivos bacterianos líquidos [30]. El ADN extraído se diluyó hasta aproximadamente 20 ng μL^{-1} y el gen 16S se amplificó por PCR con los cebadores universales 27F/1492R [31]. Los productos de PCR se purificaron por métodos estándar y se secuenciaron por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se limpiaron y ensamblaron con programas bioinformáticos especializados y se compararon con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI mediante BLAST, lo que permitió la identificación taxonómica por homología de secuencias. Con las secuencias de las siete especies identificadas, junto con secuencias de la base de datos del NCBI, se construyó un árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S.

3. Resultados

3.1. Caracterización fisicoquímica

3.1.1. Temperatura, pH y conductividad eléctrica

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos básicos se presentan en la Tabla 3. La temperatura fue de 22.7 °C en el biofertilizante anaeróbico y de 24.8 °C en el aeróbico. El pH fue de 4.6 y 5.5, respectivamente, es decir, un ambiente ligeramente ácido en ambos casos, y la conductividad eléctrica fue de 4.92 dS m^{-1} en el biofertilizante anaeróbico y de 4.31 dS m^{-1} en el aeróbico, lo que indica una concentración de sales solubles suficiente para la nutrición de las plantas, aunque señala la necesidad de un manejo adecuado para prevenir efectos adversos.

Tabla 3. Temperatura, pH y conductividad eléctrica de los biofertilizantes anaeróbico y aeróbico de origen ruminal.

Parámetro	Anaeróbico	Aeróbico
Temperatura (°C)	22.7	24.8
pH	4.6	5.5
Conductividad eléctrica (dS m^{-1})	4.92	4.31

3.1.2. Macronutrientes primarios y secundarios

Ambos biofertilizantes contuvieron los seis macronutrientes analizados (Tabla 4). Entre los primarios, el biofertilizante anaeróbico registró 1.0 % de N, 0.04 % de P y 0.29 % de K, frente a 0.81 %, 0.01 % y 0.13 % en el aeróbico. Entre los secundarios, el calcio fue igual en ambos (0.45 %), mientras que el magnesio fue de 0.19 % en el anaeróbico y 0.09 % en el aeróbico, y el azufre de 0.11 % y 0.04 %, respectivamente.

Tabla 4. Macronutrientes primarios y secundarios (%) de los biofertilizantes de origen ruminal.

Elemento	Anaeróbico (%)	Aeróbico (%)
Nitrógeno (N)	1.0	0.81
Fósforo (P)	0.04	0.01
Potasio (K)	0.29	0.13
Calcio (Ca)	0.45	0.45
Magnesio (Mg)	0.19	0.09
Azufre (S)	0.11	0.04

3.1.3. Micronutrientes y metales pesados

En los micronutrientes destacó la concentración de hierro, de 96 ppm en el biofertilizante anaeróbico y 95 ppm en el aeróbico (Tabla 5). Los niveles de boro, zinc, cobre y manganeso fueron de 19, 8, 6 y 7 ppm en el anaeróbico y de 15, 6, 3 y 7 ppm en el aeróbico, es decir, concentraciones relativamente bajas y similares entre ambos tipos de fermentación. Los metales pesados cadmio y plomo estuvieron presentes en ambos biofertilizantes en concentraciones idénticas, de 0.02 y 0.5 mg kg^{-1}, respectivamente.

Tabla 5. Micronutrientes (ppm) y metales pesados (mg kg^{-1}) de los biofertilizantes de origen ruminal.

Elemento	Anaeróbico	Aeróbico
Micronutrientes (ppm)		
Boro (B)	19	15
Zinc (Zn)	8	6
Cobre (Cu)	6	3
Hierro (Fe)	96	95
Manganeso (Mn)	7	7
Metales pesados (mg kg^{-1})		
Cadmio (Cd)	0.02	0.02
Plomo (Pb)	0.5	0.5

3.2. Caracterización microbiológica

3.2.1. Morfología colonial y pruebas bioquímicas

Se obtuvieron diez cepas bacterianas aisladas, cinco del biofertilizante anaeróbico (A1–A5) y cinco del aeróbico (B1–B5). Todas presentaron colonias de forma circular con borde irregular. Ocho cepas mostraron elevación plana y solo A5 y B3 presentaron elevación. Las cepas A1, A2, A4, B1 y B2 tuvieron superficie lisa y color blanco; A3 y B4 superficie lisa y color amarillo; A5 y B3 superficie elevada y color blanco; y B5 superficie rugosa y color blanco (Tabla 6). Las observaciones microscópicas mostraron morfologías de cocos (A3 y B4), diplococos (A1, A2 y B1), estreptococos (A4, B3 y B5) y bacilos (A5 y B2) (Figura 1).

Todas las cepas fueron catalasa positivas, con rápida liberación de burbujas. En la prueba de oxidasa, siete cepas (A3, A4, A5, B1, B2, B3 y B5) dieron reacción positiva, con cambio de color a púrpura, y tres (A1, A2 y B4) no presentaron reacción. En la tinción de Gram, siete cepas (A1, A2, A3, A5, B2, B3 y B5) mostraron coloración rosada o rojiza, propia de bacterias Gram negativas, y tres (A4, B1 y B4) fueron Gram positivas (Tabla 6).

Tabla 6. Características de las colonias y pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de los biofertilizantes anaeróbico (A) y aeróbico (B). Todas las cepas presentaron colonias de forma circular y borde irregular.

Cepa	Elevación	Superficie	Color	Gram	Catalasa	Oxidasa
A1	Plana	Lisa	Blanco	Negativa	+	–
A2	Plana	Lisa	Blanco	Negativa	+	–
A3	Plana	Lisa	Amarillo	Negativa	+	+
A4	Plana	Lisa	Blanco	Positiva	+	+
A5	Elevada	Elevada	Blanco	Negativa	+	+
B1	Plana	Lisa	Blanco	Positiva	+	+
B2	Plana	Lisa	Blanco	Negativa	+	+
B3	Elevada	Elevada	Blanco	Negativa	+	+
B4	Plana	Lisa	Amarillo	Positiva	+	–
B5	Plana	Rugosa	Blanco	Negativa	+	+

+ = reacción positiva; – = reacción negativa.

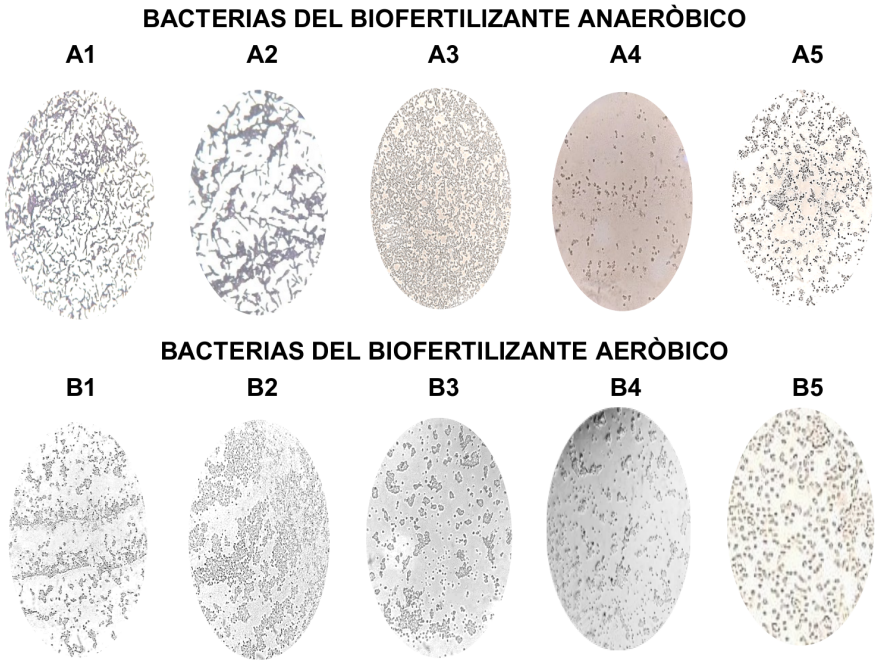


Figura 1. Morfología celular de las cepas aisladas de los biofertilizantes anaeróbico (A1–A5) y aeróbico (B1–B5).

3.3. Caracterización molecular

3.3.1. Identificación mediante secuenciación del gen ARNr 16S

La secuenciación del gen ARNr 16S por el método de Sanger permitió identificar las cepas con altos niveles de identidad respecto a las secuencias de la base de datos del NCBI (Tabla 7). La muestra A1 presentó 99.72 % de identidad con *Bacillus pumilus*; las muestras A2 y B5, 98.88 % con *Pseudomonas veronii*; la muestra A3, 98.95 % con *Pseudomonas fluorescens*; las muestras A4 y B4, 99.75 % con *Rhizobium leguminosarum*; y las muestras A5 y B1, 99.20 % con *Bacillus licheniformis*. En el biofertilizante aeróbico, la muestra B2 mostró 100 % de identidad con *Bacillus megaterium* y la muestra B3, 99.53 % con *Pseudomonas aeruginosa*. Cada resultado fue respaldado con los códigos de accesión obtenidos del análisis BLAST. Tres especies (*P. veronii*, *R.*

leguminosarum y *B. licheniformis*) se identificaron en ambos biofertilizantes; *B. pumilus* y *P. fluorescens* solo en el anaeróbico, y *B. megaterium* y *P. aeruginosa* solo en el aeróbico.

Tabla 7. Identificación de las cepas por comparación con la base de datos GenBank del NCBI.

Muestra	Organismo	Cepa de referencia	Identidad (%)	N.º de accesión
A1	*Bacillus pumilus*	SR73	99.72	KY111720.1
A2, B5	*Pseudomonas veronii*	G-16-S	98.88	OP107882.1
A3	*Pseudomonas fluorescens*	QHJ301	98.95	MK217783.1
A4, B4	*Rhizobium leguminosarum*	CC283b	99.75	U40388.1
A5, B1	*Bacillus licheniformis*	HS10	99.20	OK090945.1
B2	*Bacillus megaterium*	GDH	100	LK055286.1
B3	*Pseudomonas aeruginosa*	HMSC071F02	99.53	NZ_KV833491.1

3.3.2. Análisis filogenético

El árbol filogenético construido con las secuencias del gen ARNr 16S de las siete especies bacterianas permitió observar sus relaciones evolutivas (Figura 2). *Pseudomonas veronii* y *P. fluorescens* mostraron la mayor cercanía entre sí (distancias de 0.00934 y 0.01390), y *P. aeruginosa* (0.27736) se ubicó en una rama relacionada con otras especies del género *Pseudomonas*. *Bacillus megaterium* (0.33613) y *B. licheniformis* (0.03429) presentaron una relación evolutiva cercana, y *B. pumilus* (0.02494) se ubicó en una rama próxima a ambas. *Rhizobium leguminosarum*, con una distancia de 0.25481, evidenció una divergencia evolutiva más antigua respecto de las demás.

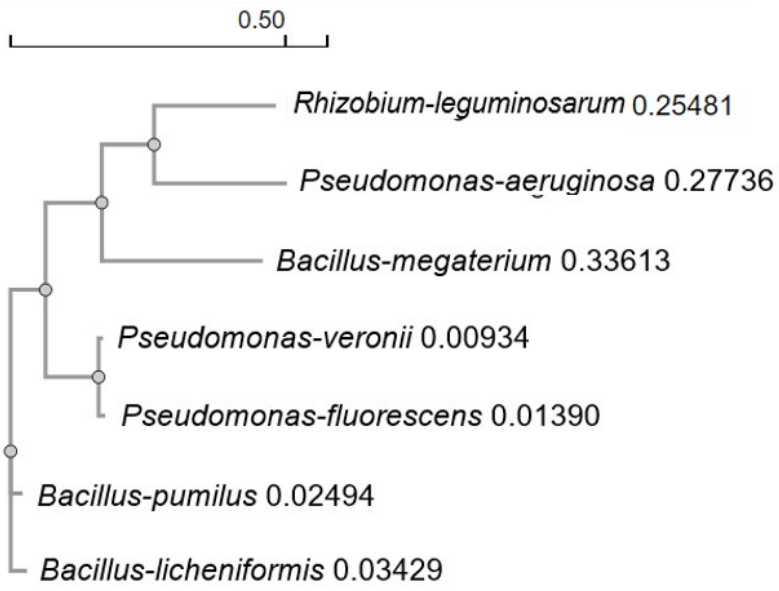


Figura 2. Relación filogenética de las bacterias aisladas de los biofertilizantes aeróbico y anaeróbico, basada en la secuencia del gen ARNr 16S.

4. Discusión

Los indicadores fisicoquímicos de los biofertilizantes aeróbico y anaeróbico fueron comparables, lo que sugiere que, independientemente del tipo de fermentación, los biofertilizantes derivados de contenido ruminal presentan características similares en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, clave para su estabilidad y efectividad en aplicaciones agrícolas. Este resultado coincide con lo señalado por Encina y Cantoni [32], quienes indican que los valores registrados se ubican dentro

del rango aceptable y que se alcanzó la temperatura óptima para la digestión aeróbica y anaerobia, un rango crucial para mantener una actividad microbiana estable y una descomposición adecuada de la materia orgánica. También es consistente con el trabajo de Hassan y Abdulsalam [33], quienes encontraron similitudes en los parámetros fisicoquímicos de biofertilizantes producidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas lo que refuerza la idea de que la matriz de origen y la riqueza de nutrientes son factores determinantes en la calidad final del producto.

El pH y la conductividad eléctrica son parámetros críticos para evaluar la calidad de un biofertilizante [11,34]. Los valores ácidos observados (4.6 y 5.5) concuerdan con lo planteado por Dutta et al. [35], quienes señalan que un pH equilibrado es fundamental para la solubilidad de los nutrientes y su disponibilidad para las plantas; esto sugiere que los biofermentos de origen ruminal son adecuados desde la perspectiva fisicoquímica y podrían ser beneficiosos para la fertilidad del suelo y el crecimiento vegetal. Debe considerarse, no obstante, que la conductividad eléctrica es una medida de la salinidad y que su exceso puede ser perjudicial para las plantas [12], por lo que los valores de 4.92 y 4.31 dS m^{-1} aconsejan un manejo adecuado del producto.

En cuanto a los nutrientes, ambos biofermentos aportaron los macronutrientes y micronutrientes que se reconocen como constituyentes del biol [13,14]. Los micronutrientes presentaron concentraciones similares en ambos tipos de fermentación, lo que indica que el tipo de fermentación no tuvo relevancia en la cantidad de estos elementos; en los macronutrientes, el biofertilizante anaeróbico mostró valores numéricamente superiores de N, P, K, Mg y S, aunque, dado el diseño descriptivo del estudio, no se aplicaron pruebas de significancia que permitan afirmar que estas diferencias sean estadísticas. Los metales pesados cadmio y plomo se detectaron en bajas concentraciones y en valores idénticos en ambos biofertilizantes; su monitoreo es importante por su potencial toxicidad y su impacto en la calidad del suelo y la salud de las plantas, y su manejo debe evitar la acumulación en el suelo y en la cadena alimentaria. Por otra parte, la preparación de los biofertilizantes difirió en el tiempo de cosecha (30 días en el aeróbico y 60 días en el anaeróbico), factor que debe tenerse en cuenta al interpretar las diferencias observadas.

La forma circular con borde irregular y las diferencias en elevación y superficie observadas en las colonias son características comunes en muchas bacterias; las características morfológicas de las colonias son indicadores clave en la identificación de microorganismos, aunque no son concluyentes por sí solas [36]. Que todas las colonias fueran circulares sugiere que los microorganismos podrían pertenecer a grupos de crecimiento rápido en medios sólidos, como muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Todas las cepas fueron catalasa positivas, lo que implica la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua y protegerse del daño oxidativo; la catalasa positiva es una característica común de bacterias aerobias o facultativamente anaerobias [37], lo que indicaría que estos microorganismos prosperan en condiciones con oxígeno. La actividad oxidasa, indicadora de bacterias aerobias y microaerofílicas, se detectó en siete de las diez cepas.

La mayoría de las cepas resultaron Gram negativas. Las bacterias Gram negativas son relevantes no solo desde el punto de vista clínico sino también ecológico: en ambientes complejos, como los biofermentos o las muestras ambientales, intervienen en los ciclos de nutrientes [38], por lo que las cepas aisladas podrían participar en procesos de biodegradación o en interacciones simbióticas con otras bacterias. Sin embargo, la tinción de Gram es un punto de partida para la clasificación taxonómica y los métodos moleculares, como la secuenciación del gen ARNr 16S, son esenciales para una identificación precisa [39]. Un ejemplo es el de las cepas A4 y B4, identificadas molecularmente como *R. leguminosarum* aunque resultaron Gram positivas en la tinción, mientras

que los rizobios se describen como bacilos Gram negativos [40]; esta diferencia refuerza la necesidad de complementar las pruebas fenotípicas con la identificación molecular.

La identificación molecular reveló especies con funciones relevantes para la agricultura. *Bacillus pumilus* se utiliza ampliamente en la agricultura por sus propiedades beneficiosas: puede promover el crecimiento de las plantas, protegerlas contra patógenos, mejorar la calidad del suelo y actuar como agente de control biológico frente a hongos, bacterias y nematodos. *Bacillus licheniformis* destaca por su capacidad de producir compuestos antimicrobianos y enzimas industriales, y *B. megaterium* por sus aplicaciones en biorremediación y biofertilizantes. Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran entre las rizobacterias más importantes para la promoción del crecimiento vegetal [41] y forman esporas que les permiten sobrevivir en condiciones adversas, además de interactuar con las plantas mediante señales químicas que facilitan la colonización de las raíces [42]. *Rhizobium leguminosarum* es esencial en la fijación biológica de nitrógeno en plantas leguminosas, en una asociación simbiótica en la que la planta aporta azúcares como fuente de energía [40].

El género *Pseudomonas* se caracteriza por su notable capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y es ambivalente, pues incluye especies beneficiosas y otras patógenas [43]. *Pseudomonas veronii* tiene funciones en la biodegradación de contaminantes y en la promoción del crecimiento vegetal, y *P. fluorescens* es una especie ampliamente estudiada por sus propiedades bioestimulantes y biocontroladoras [44]. *Pseudomonas aeruginosa* es de interés tanto clínico [45] como ambiental, con potencial en la biorremediación y en la producción de bioproductos [43]. El agrupamiento de *P. aeruginosa* con *P. veronii* y *P. fluorescens* en el árbol filogenético es consistente con estudios previos que han demostrado que estas especies comparten un ancestro común reciente y similitudes genéticas significativas, junto con su capacidad de adaptarse a diversos ambientes [46]. La presencia de *P. aeruginosa* y de bacterias Gram negativas en los biofermentos, así como su resistencia inherente a los antibióticos, hace recomendable evaluar su sensibilidad a antimicrobianos en estudios futuros.

Este estudio tiene limitaciones que orientan las investigaciones posteriores. El diseño fue descriptivo y transversal, con dos tratamientos que difirieron en el tiempo de cosecha, y no incluyó la comparación con fertilizantes químicos convencionales planteada en la hipótesis original, por lo que los resultados respaldan la riqueza de nutrientes y la diversidad bacteriana de los biofermentos, pero no permiten concluir sobre su eficacia agronómica frente a aquellos. Se sugiere analizar otros parámetros fisicoquímicos, como la materia orgánica y la capacidad de retención de agua; monitorear la calidad de los biofertilizantes durante el almacenamiento; evaluar las propiedades antimicrobianas y metabólicas de las cepas aisladas; optimizar las condiciones de fermentación (temperatura, pH y tiempo de retención) mediante diseño experimental; y emplear secuenciación de nueva generación para una caracterización más detallada de la microbiota.

5. Conclusión

Los biofertilizantes de origen ruminal bovino obtenidos por fermentación aeróbica y anaeróbica presentaron características fisicoquímicas similares: pH ácido (5.5 y 4.6), conductividad eléctrica de 4.31 y 4.92 dS m^{-1} y concentraciones comparables de micronutrientes, con hierro como el más abundante (95 y 96 ppm). Ambos contuvieron nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre, con valores numéricamente superiores de N, P, K, Mg y S en el biofertilizante anaeróbico, y cadmio y plomo en bajas concentraciones (0.02 y 0.5 mg kg^{-1}).

Se aislaron diez cepas bacterianas, todas catalasa positivas, siete oxidasa positivas y siete Gram negativas. La secuenciación del gen ARNr 16S permitió identificar siete especies con 98.88–100 % de identidad (*Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas veronii*, *P. fluorescens*,

P. aeruginosa y *Rhizobium leguminosarum*), tres de ellas comunes a ambos biofertilizantes. El árbol filogenético evidenció la mayor cercanía genética entre las especies del mismo género.

Estos resultados indican que los biofermentos ruminales son una fuente de nutrientes y de una diversidad bacteriana con roles potenciales en la degradación de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno y la promoción del crecimiento vegetal, y constituyen una base para estudios futuros sobre sus propiedades metabólicas, su eficacia agronómica y sus aplicaciones biotecnológicas en la agricultura sostenible.

Contribución de autores: conceptualización, L.A.B.P. y M.R.H.; metodología, L.A.B.P.; investigación, L.A.B.P.; análisis formal, L.A.B.P.; redacción—borrador original, L.A.B.P.; redacción—revisión y edición, L.A.B.P. y M.R.H.; supervisión, M.R.H. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Los autores financiaron en su integridad el estudio.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Acevedo-Alcalá, P.; Taboada-Gaytán, O.-R.; Cruz-Hernández, J. Caracterización de fertilizantes orgánicos y estiércoles para uso como componentes de sustrato. *Acta Agron.* **2020**, *69*, 234–240.
2. Ramírez, L.A.G.; Cabrera, F.A.L.; Escobedo, M.K.L.; Vásquez, C.B.B.; Torres, C.A.L. Biofertilizante "biol": caracterización física, química y microbiológica. *Alfa Rev. Investig. Cienc. Agron. Vet.* **2023**, *7*, 336–345.
3. Beltrán-Pineda, M.E.; Bernal-Figueroa, A.A. Biofertilizantes: alternativa biotecnológica para los agroecosistemas. *Rev. Mutis* **2022**, *12*.
4. Isique Huaroma, I.E. Influencia de Microorganismos eficientes para la producción de biofertilizantes a partir de residuos hidrobiológicos generados por las Plantas Pesqueras de Tacna, 2018. **2022**.
5. Villamar Moreira, J.P. Efectos del biol bovino en rendimientos de biomasa verde y valores nutricionales del pasto saboya (Megathyrsus maximus). **2022**.
6. Oblitas Castro, M.A. Aplicación de biol en cultivos de rábano (Raphanus sativus). **2019**.
7. Florez Jalixto, M.A.; Roldán Acero, D.J.; Juscamaita Morales, J.G. Evaluación de fitotoxicidad y caracterización de un fertilizante líquido elaborado mediante fermentación láctica utilizando subproductos del procesamiento de trucha (Oncorhynchus mykiss). *Ecol. Apl.* **2020**, *19*, 121–131.
8. Colchado, T.Y.A.; Ramos, A.L.S.; Carlos, J.M.V. Efecto de la adición de roca fosfórica y alfalfa en el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio de tres muestras de biol. *REBIOL* **2021**, *41*, 187–194.
9. Schlegel, M.M.; Ibrahim, B.; Kipping-Rossel, D.; Ortiz-Laurel, H.; Fras, J. Generación de biocarbón a partir del material sólido en la hidrólisis aeróbico-microbiológica. *AGROProductividad* **2018**, *11*, 27–34.
10. Vela, D.R.M.; Castro, J.O.O.; Moya, A.E.A. Caracterización fisicoquímica del biol en varias mezclas generadas por biodigestión. *Rev. Recur. Nat. Prod. Sostenibilidad* **2024**, *3*, 35–51.
11. Samaniego, J.J. Preparación de biol a partir de residuos orgánicos. *Rev. RedBioLAC* **2022**, *6*, 51–55.
12. Armijo Hidalgo, J.T.; Vera Sánchez, J.A. Evaluación de la producción de biogás y biol en un biodigestor tipo batch utilizando residuos orgánicos del camal del cantón San José de Chimbo. **2024**.
13. Espinoza Garcia, R. Evaluación de los macronutrientes del biol producido con los microorganismos eficientes y Garlac® en agua del beneficio húmedo del café, Chirinos, San Ignacio. **2023**.
14. Cárdenas, J.A.L.; Diaz, Á.H.C.; Chang, D.J.V.; Chang, Y.J.V. Efectos del biol industrial complementado con algas marinas sobre el rendimiento del cultivo rábano (Raphanus sativus L.). *Alfa Rev. Investig. Cienc. Agron. Vet.* **2023**, *7*, 442–452.
15. Paolini Gómez, J.E. Actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos cafetaleros de los Andes venezolanos. *Terra Latinoam.* **2018**, *36*, 13–22.
16. Ruiz, E.M. Efecto de tres tipos de abono orgánico líquido (biol), en la etapa de desarrollo en vivero de bolaina blanca (Guazuma crinita C. Martius) en Pucallpa Perú. *Tzhoecoen* **2018**, *10*, 371–382.
17. La Torre Zamora, L.S. Determinación de la dosis óptima de biol producido a partir de estiércol de Cavia porcellus en el rendimiento de alfalfa. **2019**.

18. Sanz Heras, S. Identificación y caracterización de microorganismos alterantes del vino en bodega: revisión de aplicaciones de las nuevas técnicas moleculares. **2018**.
19. García León, M.F. Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociadas a la rizósfera de Prosopis pallida "algarrobo". **2020**.
20. Nolasco-Cárdenas, O.; Chacón-Aguilar, C.; Salas-Alva, L.; Velarde-Vilchez, M.; Murrugarra-Bringas, Y.; Gutiérrez-Román, A.I. Identificación bacteriana mediante secuenciación del gen 16S rRNA a partir de muestras de pudrición blanda del pseudotallo del banano. *Paideia XXI* **2023**, *13*, 335–343.
21. Comonfort, J.H.R. Frederick Sanger: La secuenciación del alfabeto de la vida: Vida y aportes de Sanger a la genómica. *Rev. Divulg. Cient. iBIO* **2022**, *4*, 42–45.
22. Martín, J.M.V.; Ortigosa, F.; Cañas, R.A. Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros Biol.* **2020**, *13*, 19–25.
23. Huerta Muñoz, E.; Cruz Hernández, J.; Aguirre Álvarez, L. La apreciación de abonos orgánicos para la gestión local comunitaria de estiércoles en los traspatios. *Estud. Soc. Rev. Aliment. Contemp. Desarro. Reg.* **2019**, *29*.
24. Barrera-Herrera, J.-A.; Díaz-Rojas, C.-A.; Prat, N.; Roa-Fuentes, C.-A. Macroinvertebrados acuáticos en un gradiente altitudinal del río Garagoa, Andes orientales de Colombia. *Rev. Biol. Trop.* **2023**, *71*, 1–23.
25. Ramírez-González, S.; Cruzata-Manuel, R.; Zorrilla-Velazco, M.; Jiménez-Prieto, Y.; Pérez-Villar, M.M.; Cruz-Bermúdez, Y.; Morera-Hernández, L.E. Cuantificación de los contenidos de nitrato en aguas de pozo y aguas residuales con el empleo de electrodos selectivos. *Rev. Cubana Quím.* **2018**, *30*, 131–142.
26. Métodos EPA. Documento de Técnicas de Control de Materia Particulada Fina Proveniente de Fuentes Estacionarias; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA, **1998**; pp. 1–288.
27. Azcarate, M.P.; Baglioni, M.; Brambilla, C.; Brambilla, E.; Fernandez, R.; Kloster, N.S.; Noellemeyer, E.J.; Ostinelli, M.; Pérez, M.; Quiroga, A. Métodos de análisis e implementación de Calidad en el Laboratorio de Suelos. **2017**.
28. Baquero, M.; Casart, Y. Evaluación de métodos de extracción de ADN genómico para la identificación de Leptospira spp en muestras de orina bovina mediante por PCR. *Rev. Investig. Vet. Perú* **2020**, *31*, e15522.
29. Revelo, A.; De La Torre, E.; Martínez, G.; Baquero, M.; Casart, Y. Evaluación de métodos de extracción de ADN genómico para la identificación de Leptospira spp en muestras de orina bovina mediante por PCR. *Rev. Investig. Vet. Perú* **2020**, *31*.
30. Bellés, P. Cuando los discos duros fueron reemplazados por bacterias: futuras aplicaciones de la ingeniería genética. *Biol. On-line Rev. Divulg. Fac. Biol.* **2018**, *7*.
31. Corona Martínez, J.D.; Pérez Soto, E.; Sánchez Monroy, V. Identificación molecular de bacterias en salud y enfermedad periodontal. *Rev. Odontol. Mex.* **2019**, *23*, 23–30.
32. Encina, M.L.A.; Cantoni, C.N.B. Lodo Aerobio como Inoculante para Arranque de un Biorreactor Anaerobio y como Biofertilizante. *Rev. Estud. Investig. Saber Acad.* **2016**, 63–68.
33. Hassan, D.U.; Abdulsalam, S. Assessement of bio-fertilizer quality of anaerobic digestion of watermelon peels and cow dung. *Chem. Biomol. Eng.* **2017**, *2*, 135–141.
34. Zambrano Ruiz, T.Y. Efecto de los microorganismos efectivos en la calidad del biol. **2021**.
35. Dutta, P.; Das, K.; Patel, A. Influence of organics, inorganic and biofertilizers on growth, fruit quality, and soil characters of Himsagar mango grown in new alluvial zone of West Bengal, India. *Adv. Hortic. Sci.* **2016**, *30*, 81–86.
36. Morales-Mena, B.; Hernández-Forte, I.; Nápoles-García, M.C. Estabilidad microbiológica de los biofertilizantes Azofert®-F y Azofert®-S. *Cultiv. Trop.* **2023**, *44*.
37. Leiva Trujillo, B.F. Elaboración de biofertilizante a partir de estiércol de ganado vacuno y efluente del proceso de fermentación cervecera mediante fermentación homoláctica. **2018**.
38. Abad, V.; Koch, A. Evaluación del crecimiento y valor nutricional de la soya para forraje (Glycine max) utilizando biol como abono obtenido con microorganismos nativos. Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas: Sangolquí, Ecuador, **2014**.
39. Moreno López, J.A.; Velarde Escobar, K.E. Aislamiento, caracterización y usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico durante el periodo 2016. **2016**.

CaMeRa

40. Rodríguez-Gonzales, A.; Zárate-Villarroe, S.G.; Bastida-Codina, A. Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Rev. Cienc. Ambient.* **2022**, *56*, 178–208.
41. Bueno Nieto, C.F. Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante el uso de la lacasa recombinante de Bacillus sp. FNT. **2023**.
42. Coello Galvez, R.P. Efectos de la aplicación de bacterias biorremediadores (Bacillus sp.) al agua de estanques acuícolas, frente a vibrios patógenos. **2021**.
43. Luján, D. Uso de Pseudomonas aeruginosa en biorremediación. *Bio Tecnol.* **2019**, *23*, 32–42.
44. Meena, B. Biological control of pest and diseases using fluorescent pseudomonads. *Basic Appl. Asp. Biopestic.* **2014**, 17–29.
45. Pestaña, M.Í.; Del Pozo, J. Infecciones por bacilos Gram negativos no fermentadores: Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp. y Stenotrophomonas maltophilia. *Medicine* **2018**, *12*, 2931–2940.
46. Silby, M.W.; Winstanley, C.; Godfrey, S.A.; Levy, S.B.; Jackson, R.W. Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 652–680.

© 2026 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/