

Artículo de investigación

Mariponasa: Transformando las heces de larvas de mariposas en biofertilizante

Mariponasa: Transforming butterfly larval feces into biofertilizer

Lady Carolina Castañeda Bata¹, Luz Dary Pedraza Hernández², Hebandreyna González García³, Joan Sebastian Gracia Rojas⁴, Tatiana Navarro Tamayo⁵

¹Ingeniera Ambiental de la Corporación Universitaria del Meta (UNIMETA), Villavicencio, Meta, Colombia, Código Postal: 500001, correo electrónico: ing.ambiental1990bata@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-1029-2448>, ²Investigadora del Centro de Investigaciones Ambientales “José Antonio Candamo” – CIAM, Corporación Universitaria del Meta (UNIMETA), Villavicencio, Meta, Colombia, Código Postal: 500001, correo electrónico: luz.pedraza@unimeta.edu.co, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1403-3383>, ³Centro de Investigaciones Ambientales “José Antonio Candamo” – CIAM, Corporación Universitaria del Meta (UNIMETA), Villavicencio, Meta, Colombia, Código Postal: 500001, correo electrónico: hebandreyna.gonzalez@unimeta.edu.co, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9622-1139>, ⁴Ingeniero Ambiental de la Corporación Universitaria del Meta (UNIMETA), Villavicencio, Meta, Colombia, Código Postal: 500001, correo electrónico: ing.sebastiangraciarojas@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-8495-7107>, ⁵Ingeniera Ambiental de la Corporación Universitaria del Meta (UNIMETA), Villavicencio, Meta, Colombia, Código Postal: 500001, correo electrónico: ing.tatiananavarrotamayo@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-5710-1986>.

RESUMEN

Los biofertilizantes elaborados a partir de heces de animales se constituyen como una alternativa sostenible y ecológica frente al uso de fertilizantes químicos convencionales. Esta práctica permite el aprovechamiento de subproductos de origen animal para mejorar la fertilidad del suelo. Además de aportar nutrientes esenciales, estos biofertilizantes favorecen la actividad microbiana benéfica, lo que contribuye a mejorar la estructura del suelo y a optimizar la disponibilidad de nutrientes para las plantas. En este sentido, se consideró analizar las heces de cuatro especies de larvas de mariposas, a saber: *Battus polydomas*, *Metemorpha elissa*, *Methona confusa*, *Hamadryas* para saber si estas pueden considerarse abono orgánico o biofertilizante. Asimismo, se caracterizó la microbiota de las muestras de mariponasa estas se sembraron en medio selectivos y nutritivos PCA, Agar Czapek y Agar Mac Conkey, también, se sometieron a pruebas bioquímicas SIM, TSI y LISINA, además, se realizó tinción de Gram para identificar y caracterizar los microorganismos presentes. Dentro de los resultados se mostraron altas concentraciones de mesófilos aerobios y una notable presencia de bacterias nitrificantes y enterobacterias, con *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae* identificadas como las especies predominantes, de igual manera, la tinción de Gram confirmó la presencia de bacilos gramnegativos.

Palabras clave: Fertilización orgánica, entomofauna, mariposas.

ABSTRACT

Biofertilizers made from animal manure represent a sustainable and environmentally friendly alternative to conventional chemical fertilizers. This practice enables the utilization of animal by-products to enhance soil fertility. In addition to supplying essential nutrients, these biofertilizers promote beneficial microbial activity, which helps improve soil structure and optimize nutrient availability for plants. In this regard, it was considered to analyse the feces of four species of butterfly larvae, namely: *Battus polydomas*, *Metemorpha elissa*, *Methona confusa*, *Hamadryas*, to determine whether they can be considered as organic manure or biofertilizer. The microbiota of the samples of mariponase were also characterized, these were sown in selective and nutritive medium PCA, Agar Czapek and Agar Mac Conkey, also subjected to biochemical tests SIM, TSI and LYSINE, in addition, Gram staining was performed to identify and characterize the microorganisms present. The results showed high concentrations of aerobic mesophiles and a notable presence of nitrifying bacteria and enterobacteria, with *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* identified as the predominant species, Gram staining confirmed the presence of Gram-negative bacilli.

Keywords: Organic fertilization, entomofauna, butterflies.

Recibido: 12-12-2024

Aceptado: 21-03-2025

Publicado: 21-03-2025

Autor de correspondencia: González García Hebandreyna;
hebandreyna.gonzalez@unimeta.edu.co ; +573026626486.

Introducción

La conciencia ambiental es un principio básico, el cual cabe en todos los contextos, a la hora de hablar de agricultura, se debe primar el termino sostenible, esta agricultura sostenible principalmente debe buscar la reducción de productos químicos e implementar métodos sostenibles, bajo este contexto, los biofertilizantes se muestran como una importante alternativa ecológica frente a los fertilizantes químicos convencionales.

Los biofertilizantes han surgido como un componente alternativo crucial en la agricultura sostenible, estos ofrecen gran cantidad de beneficios que mejoran la calidad y/o fertilidad del suelo, la productividad de los diferentes cultivos y sobre todo el bienestar ecológico; estos incluyen microorganismos como las bacterias y los hongos los cuales son beneficiosos, juegan un papel importante a la hora de mejorar la disponibilidad de nutrientes y a su vez promueve el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, los biofertilizantes ofrecen mejoras en la fijación del nitrógeno, solubilizar el fósforo y darle estímulo a la actividad microbiana en el suelo, mejorando así la salud del suelo y el rendimientos de las plantas (Mehata et al., 2023).

El uso de los biofertilizantes es altamente beneficioso en las prácticas de agricultura orgánica, en donde se disminuye el uso de fertilizantes químicos (Kumar et al., 2024). Diferentes estudios han evidenciado que los biofertilizantes además de mejoran las propiedades físicas y químicas del suelo, mejoran la actividad biológica, que es primordial para el ciclo de nutrientes y la salud del suelo (Kumar et al., 2023).

El uso de inóculos microbianos puede aumentar notablemente la disponibilidad de nitrógeno en los suelos, además, las bacterias solubilizadoras de fosfato pueden generar que el fósforo este más disponible para las plantas (Talwar et al., 2017). La doble acción de los biofertilizantes en mejora de la absorción de nutrientes y estructura del suelo, los posicionan como una opción ideal para las diferentes prácticas agrícolas sostenibles (Daniel et al., 2022). Asimismo, se descubrió que los fertilizantes inciden positivamente en la resiliencia de cultivos ante estrés biótico y abiótico, también, ayudan a mejorar la tolerancia de las plantas a los diferentes estreses ambientales, tales como la sequía y la salinidad, incrementan además la resistencia a los patógenos por medio de la colonización competitiva de la zona radicular (Seenivasagan & Babalola, 2021).

Lo anteriormente mencionado, es muy importante en un contexto de cambio climático, en el cual los cultivos están día a día más expuestos a diferentes condiciones adversas; con la integración de los biofertilizantes en los procesos agrícolas, no solo se favorece la seguridad alimentaria, también, se promueve el equilibrio ecológico, ya que se reduce considerablemente la dependencia a los diferentes

insumos químicos que afectan directamente el medio ambiente y a la población en general (Qiu et al., 2022).

La aplicación de biofertilizantes conduce a una mejor calidad de cultivos, como se demuestra en estudios que muestran perfiles de nutrientes mejorados en diferentes cultivos tratados con los ya mencionados insumos orgánicos (Nour El-Din & Salem, 2015). Por tal motivo, se consideró analizar las heces de cuatro especies de larvas de mariposas como son la *Battus polydomas*, *Metemorpha elissa*, *Methona confusa*, y *Hamadryas*, para saber si estas pueden considerarse abono orgánico o biofertilizante.

En las últimas décadas, la agricultura ha experimentado una creciente dependencia de los fertilizantes químicos, lo que ha provocado problemas medioambientales como la contaminación del agua, la pérdida de fauna, la degradación del suelo. Como alternativa, los fertilizantes orgánicos han ganado popularidad debido a sus beneficios ecológicos, como la mejora de la biodiversidad del suelo y la reducción de la huella de carbono. Dentro de los fertilizantes orgánicos, el uso de desechos biológicos de animales y organismos tiene un gran potencial. En esta investigación, la mariponasa podría ofrecer una nueva fuente de nutrientes para la agricultura y su posible uso en la formulación de fertilizantes orgánicos.

Materiales y métodos

Área de estudio

El material biológico utilizado en esta investigación fue adquirido del Parque Metropolitano María Lucía (PMML) de la Corporación Universitaria del Meta – UNIMETA, este se encuentra ubicado kilómetro 8 sobre la vía que comunica a Villavicencio con Puerto López, en la vereda la Llanerita, frente al Kartodromo Laguna Viva, este parque cuenta con 120 hectáreas de superficie, en este se encuentra un mariposario a cielo abierto y un domo en el cual se llevan a cabo diferentes investigaciones. Se recogieron muestras de mariponasa (heces de larvas de mariposa), para realizar su respectivo análisis en los laboratorios de la Corporación Universitaria del Meta, ubicado en el barrio San Fernando de la ciudad de Villavicencio, Meta.

Tipo de investigación

Se realizó una investigación descriptiva no experimental, para ello se sembró por triplicado las heces de cuatro especies de mariposas (*Battus polydomas*, *Metemorpha elissa*, *Methona confusa*, y *Hamadryas*), para un total de doce unidades experimentales. Consecutivamente, se realizaron las siguientes fases:

1. Siembra en profundidad en medios selectivos y nutritivos: En el contexto de la investigación microbiológica, la elección adecuada de los medios de cultivo resultó fundamental para el aislamiento y la caracterización de los microorganismos (Gurusinghe et al., 2019). Para llevar a cabo la siembra, se utilizaron tres tipos de medios. En primer

lugar, se realizó la siembra de la mariponasa en el medio nutritivo Plate Count Agar (PCA). Posteriormente, se emplearon dos medios selectivos: el primero fue el *Agar Czapek*, también conocido como *Czapek-Dox Agar*, y el segundo correspondió al *Agar MacConkey*. Cada uno de estos medios permitió favorecer el crecimiento diferencial de determinados grupos microbianos, lo que facilitó su posterior identificación y análisis.

2. Siembra en pruebas bioquímicas: Las pruebas bioquímicas, como la de motilidad, sulfuro e indol (SIM), el medio triple azúcar hierro (TSI) y la prueba de descarboxilación de lisina (LISINA), se utilizaron como herramientas fundamentales para la identificación y diferenciación de diversas especies bacterianas, especialmente dentro de la familia Enterobacteriaceae. Estas pruebas permitieron evaluar características metabólicas específicas, contribuyendo a una clasificación más precisa de los aislados.

3. Tinción de GRAM: El procedimiento de tinción de Gram se llevó a cabo mediante una serie de pasos fundamentales. En primer lugar, se preparó un frotis bacteriano sobre un portaobjetos de vidrio, el cual fue fijado mediante calor para adherir las células a la superficie. Posteriormente, se tiñó el portaobjetos con cristal violeta, un colorante que penetró la pared celular bacteriana. A continuación, se aplicó una solución de yodo como mordiente, la cual formó un complejo con el cristal violeta, facilitando su retención dentro de las células.

Luego, se procedió a lavar el portaobjetos con alcohol o acetona, lo que permitió la decoloración diferencial de las bacterias. Este paso fue clave para distinguir entre bacterias Grampositivas y Gramnegativas: las Grampositivas, caracterizadas por una gruesa capa de peptidoglicano, retuvieron el complejo cristal violeta-yodo y conservaron una coloración púrpura; en contraste, las Gramnegativas, con una capa de peptidoglicano más delgada y una membrana externa adicional, perdieron la tinción y se tornaron incoloras. Finalmente, se aplicó una contratinción, usualmente safranina, que tiñó de color rosado a las bacterias Gramnegativas previamente decoloradas (Becerra et al., 2016).

Resultados

Se puede evidenciar en las tablas 1 y 2 en donde se presentan los recuentos microbianos obtenidos para cada una de las especies de lepidópteros, que para el caso de los mesófilos aerobios se pudo determinar que en las 4 muestras evaluadas con sus respectivas repeticiones se presentaron elevadas concentraciones de mesófilos aerobios, en algunos casos llegaron hasta ser incontables (*Battus polydomas*, *Metemorpha elissa* y *Methona confusa*).

Se hizo una última siembra en el *Agar Czapek*, el cual es selectivo para el cultivo de aquellos hongos y bacterias que pueden utilizar el nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno, lo cual las hace nitrificantes, es decir que tienen la capacidad de transformar la forma orgánica del nitrógeno, como se encuentra en la mayoría de los suelos, en forma inorgánica la cual es más asimilable para las plantas y su nutrición (Houbraken et al., 2020).

Al analizar detenidamente los resultados presentados en las Tablas 1 y 2, particularmente en las columnas que reportan los recuentos totales de cada grupo de microorganismos por especie de lepidóptero, se evidencia una similitud notable en las concentraciones de enterobacterias y bacterias nitrificantes. Por ejemplo, en *Battus polydomas*, ambos grupos bacterianos presentan concentraciones en el orden de 10^3 UFC/g (enterobacterias: 69×10^3 UFC/g; bacterias nitrificantes: 18×10^3 UFC/g). En *Metemorpha elissa*, los recuentos se ubican en el orden de 10^4 UFC/g (enterobacterias: 46×10^4 UFC/g; bacterias nitrificantes: $25,5 \times 10^4$ UFC/g). En el caso de *Methona confusa*, las concentraciones se sitúan entre los órdenes de 10^4 y 10^5 UFC/g (enterobacterias: $25,2 \times 10^4$ UFC/g; bacterias nitrificantes: 17×10^5 UFC/g). Finalmente, para *Hamadryas* spp., se registró un valor de $13,2 \times 10^4$ UFC/g para enterobacterias, mientras que el número de unidades formadoras de colonia de bacterias nitrificantes fue tan elevado que no pudo ser cuantificado con precisión.

A partir de estos resultados, se puede inferir que, dado que las concentraciones de enterobacterias y bacterias nitrificantes son similares en los distintos medios selectivos empleados, es posible que una proporción considerable de las enterobacterias aisladas en el medio Agar MacConkey posea también la capacidad de realizar procesos de nitrificación.

Este análisis fue validado mediante la observación de las colonias desarrolladas en el medio MacConkey, las cuales presentaron una coloración rojiza característica de bacterias fermentadoras de lactosa. No obstante, con el propósito de identificar de manera más precisa el microorganismo aislado a partir de la mariponasa de las cuatro especies de lepidópteros, se procedió a examinar las colonias obtenidas en el Agar MacConkey (Figura 1) siguiendo los criterios taxonómicos descritos en el manual de Bergey's (Holt, 1994).

La caracterización incluyó: determinación del color de los pigmentos en medios específicos; análisis de la morfología colonial (forma, elevación, margen, superficie y opacidad); prueba de tinción de Gram mediante métodos estándar; evaluación de la producción de ácidos, evidenciada por el cambio de color del medio; y pruebas de asimilación de distintas fuentes de carbono, a través de siembras en medios para pruebas bioquímicas específicas (Tabla 1).

Tabla 1. Recuentos microbianos de mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias nitrificantes de la mariponasa de *Battus polydamas* y *Metamorpho elissa*.

Microorganismo	<i>Battus polydamas</i> UFC/g			Recuento Total UFC/g	<i>Metamorpho elissa</i> UFC/g			Recuento Total UFC/g
	1	2	3		1	2	3	
Mesófilos aerobios (Agar Plate Count)	15 x 10 ⁴	Incontable	Incontable	15 x 10 ⁴	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
Enterobacterias (Agar Mac Conkey)	36 x 10 ³	20,4 x 10 ³	15 x 10 ⁴	69 x 10 ³	29 x 10 ⁴	12,2 x 10 ⁴	97 x 10 ⁴	46 x 10 ⁴
Bacterias nitrificantes (Agar Czapec)	13 x 10 ³	22 x 10 ³	Incontable	18 x 10 ³	25,5 x 10 ⁴	< 100	Incontable	25,5 x 10 ⁴

Tabla 2. Recuentos microbianos de mesófilos aerobios, enterobacterias y bacterias nitrificantes de la mariponasa de *Methona confusa* y *Hamadryas*

Microorganismo	<i>Methona confusa</i> UFC/g		Recuento total UFC/g	<i>Hamadryas</i> UFC/g
	1	2		
Mesófilos aerobios (Plate Count Agar)	Incontable	33 x 10 ⁴	33 x 10 ⁴	86 x 10 ³
Enterobacterias (Agar Mac Conkey)	30 x 10 ⁴	20.4 x 10 ⁴	25.2 x 10 ⁴	13.2 x 10 ⁴
Bacterias nitrificantes (Agar Czapec)	17 x 10 ⁵	< 100	17 x 10 ⁵	Incontable



Figura 1. Colonias aisladas en Agar Mac Conkey

Con el fin de determinar con mayor especificidad y exactitud la especie del microorganismo encontrado en el Agar Mac Conkey se realizaron 3 pruebas bioquímicas y de esta manera se pudo determinar las características metabólicas de la bacteria objeto de identificación.

En la tabla 3 se describen los resultados obtenidos en cada una de las pruebas bioquímicas, observando la mayor

diferencia en los resultados obtenidos por triplicado de *Battus polymodas* respecto a la movilidad (+) y a la lisina (-), comparado con los resultados obtenidos en las otras especies en donde todas obtuvieron los mismos resultados.

Si se refiere a la tabla 4 de pruebas bioquímicas, en donde se establecen los microorganismos encontrados dependiendo de su metabolismo, se puede llegar a concluir que el microorganismo obtenido de la familia enterobacteriaceae es *Enterobacter cloacae*, para *Battus polydamas*, y para las otras 3 especies estudiadas (*Metamorpho elissa*, *Methona confusa* y *Hamadryas*) sería *Klebsiella pneumoniae*.

Sin embargo, es recomendable realizar una mayor cantidad de pruebas bioquímicas para poder definir con mayor certeza cual microorganismo fue el obtenido según su batería metabólica. Para este estudio se utilizaron solo estas pruebas, por facilidad en su consecución y manejo. Por esta razón se procedió a hacer la tinción de Gram, para determinar morfológicamente la pureza de las bacterias obtenidas en las muestras de mariponasa estudiadas.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a las colonias obtenidas en el Agar Mac Conkey para cada una de las especies a las cuales se les hizo análisis microbiológico de mariponasa.

Bioquímicas	<i>Battus polydamas</i>			<i>Metamorphia elissa</i>			<i>Methona confusa</i>		<i>Hamadryas</i>
	1	2	3	1	2	3	1	2	1
Movilidad (SIM)	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Indol (SIM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
CO₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H₂S (SIM, TSI)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LISINA	-	-	-	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K

Tabla 4. Pruebas bioquímicas para identificación bacteriana

Bacterias	Indol	Voges proskawer	Citrato de simons	Urea	H ₂ S	Gas Glucosa	Movilidad	Fenilalanina	Lisina	Arginina	Sacarosa	Lactosa	Manitol
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	V	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Shigella (grupos) ABC</i>	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella thypi</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Salmonella Parathypi A</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	-	-	V	-	V	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Salmonella T. Serotypes</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter Freundii</i>	-	-	+	V	V	+	+	+	-	V	V	V	+
<i>Citrobacter Diversus</i>	+	-	+	V	-	+	+	-	-	V	V	V	+
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Klebsiella Oxytoca</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Enterobacter Aerogenes</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Enterobacter Agglomerans</i>	V	V	V	V	-	V	V	V	-	-	V	V	+
<i>Enterobacter Cloacae</i>	-	+	+	V	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Serratia Marcescens</i>	-	+	+	-	-	V	+	-	+	-	+	-	+
<i>Proteus Mirabilis</i>	-	V	V	+	+	+	+	+	-	-	V	-	-
<i>Proteus Vulgaris</i>	+	-	V	+	+	V	+	+	-	-	+	-	-
<i>Providencia Rettgeri</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	V	-	+
<i>Providencia Morgani</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Providencia Stuartii</i>	+	-	+	V	-	-	V	+	-	-	V	-	-
<i>Yersinia Enterocolitica</i>	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Yersinia Pestis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

V: Variable. +: Positivo. -: Negativo

Se tomaron colonias características de los Agares Mac Conkey utilizados en las pruebas bioquímicas y se les realizó la coloración de Gram a través del método estándar. Cuando se hizo la observación al microscopio se evidenció

la presencia de bacilos gram negativos, los cuales son propios de las características morfológicas tanto de *Klebsiella pneumoniae* como de *Enterobacter cloacae*, como se observan en las figuras 2 y 3, respectivamente.

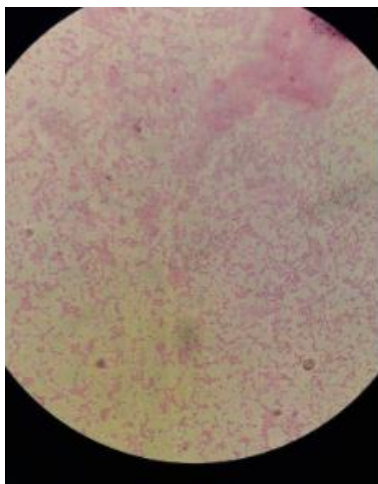


Figura 2. Coloración de Gram *Klebsiella pneumoniae*

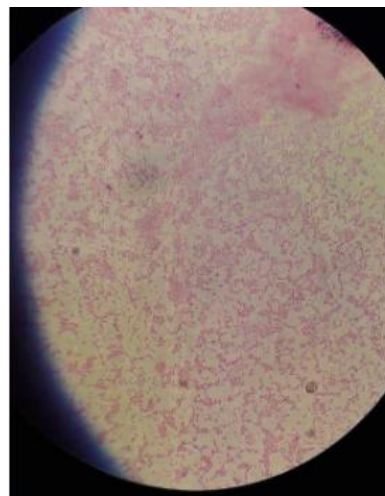


Figura 3. Coloración de Gram *Enterobacter cloacae*

Discusión

Las larvas presentan un proceso digestivo basado en la acción enzimática que ejerce la microbiota intestinal encontrada tanto en su intestino grueso como delgado, la cual varía notablemente dependiendo de la dieta específica de cada especie, y encontrando en su mayoría mesófilos aerobios y aerobios facultativos, presentan recuentos celulares de 105-107 por gramo (Clark et al., 2009).

Al realizar el análisis para los medios selectivos, se obtuvo como resultado principal en el medio Mac Conkey, la formación de colonias rojas o rosadas, debido a la fermentación de la lactosa del medio por parte de las enterobacterias y acidificación del medio (Díaz Pérez et al., 2013).

Se destaca además que la principal característica de las enterobacterias es que son bacterias gram negativas y pueden tener morfología de bacilos o cocos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales; algunas especies pueden vivir en tierra, en plantas o en animales acuáticos, otra de sus principales características es que son capaces de reducir de nitrato a nitrito, por lo cual se hacen atractivos para ser usados como biofertilizantes (Silva y Martínez, 2018).

De acuerdo con Lara et al. (2007) numerosas bacterias de la familia de las enterobacterias como *Enterobacter* sp y *Klebsiella* sp son eficientes fijadoras asimbióticas de nitrógeno contribuyendo sustancialmente a que los

agricultores economicen en fertilizantes nitrogenados y así contribuyen a la conservación del medio ambiente. Los fertilizantes químicos han sido benéficos para el sector agrícola en general, sin embargo, el abuso en la utilización de ellos genera residuos químicos, como las sales que contienen generando salinización, problemas en el drenaje, compactación del suelo y disminución de la actividad microbiana comprometida en el proceso de nutrición vegetal.

Al mencionar las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación y diferenciación de diferentes especies de bacterias se utilizó la motilidad del sulfuro indol (SIM) para la confirmación presuntiva de miembros de la familia enterobacteriaceae, a partir de cultivos puros, en base a la capacidad de producción de H₂S (sulfuro de hidrógeno), formación de indol, y manifestación de movilidad, la producción de H₂S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio, como consecuencia de la formación de un precipitado negro. Su contenido en peptona proporciona los niveles necesarios de triptófano para la producción de indol.

Para determinar si se ha producido indol, se añadió tres o cuatro gotas de reactivo de Kovac: la formación de un color rojo en la superficie del medio, se interpreta como reacción positiva, mientras que un color amarillo, como una reacción negativa; la movilidad se manifiesta por un crecimiento difuso desde la línea de inoculación hacia las paredes del tubo, mientras que aquellos microorganismos no móviles,

concentran su crecimiento alrededor de la línea de inoculación (Mosavian & Koraei, 2016).

Para el TSI: El agar triple azúcar hierro contiene tres carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa). Cuando dichos carbohidratos se fermentan, la producción resultante de ácido es detectada por el indicador rojo fenol. Se producen cambios de color: amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización (Akhi et al., 2015). Dado que la lactosa y la sacarosa se encuentran presentes en concentraciones mucho más elevadas que la glucosa, la formación de ácido en la base del tubo se debe a dichos azúcares, mientras que la formación de ácido a partir de la glucosa es suprimida por la rápida oxidación de una pequeña cantidad de ácido en el área inclinada del tubo, lo que genera una reacción de pH neutro o alcalino cuando se fermenta sólo glucosa (Mosavian & Koraei, 2016). Con un pH neutro o alcalino, el ácido sulfhídrico (producido por el tiosulfato sódico) reacciona con la sal de amonio ferroso, lo que produce sulfuro de hierro de color negro. Permite la diferenciación de los organismos fermentadores de glucosa, lactosa y/o sacarosa, además de la detección de la producción de sulfuro de hidrógeno (Atlas, 1993).

El medio de lisina y hierro (L.I.A.) es un medio de cultivo ampliamente empleado para la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos, basándose en la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y en la actividad enzimática de la lisina descarboxilasa. Asimismo, permite la detección de la actividad de la enzima lisina desaminasa (Mosavian & Koraei, 2016).

El citrato de amonio férrico y el tiosulfato de sodio actúan como indicadores de la producción de H_2S ; en presencia de esta reacción, se observa la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro en el fondo del tubo. Por su parte, los cambios en el pH del medio son detectados mediante el indicador púrpura de bromocresol: un viraje a color amarillo indica acidificación ($pH < 5,2$), mientras que un cambio hacia púrpura señala alcalinización ($pH > 6,8$).

La actividad de la lisina descarboxilasa se manifiesta por un viraje uniforme del medio a color púrpura o, en su defecto, por una coloración neutra (sin cambio aparente) en la columna del agar. En ausencia de esta enzima, se observa un viraje a amarillo en la columna y una coloración neutra en la zona inclinada.

Por otro lado, la actividad de la lisina desaminasa se evidencia como una coloración rojiza en la zona inclinada del medio, acompañada de una coloración amarilla en el fondo del tubo. Adicionalmente, en algunos casos puede observarse la producción de gas como resultado de la fermentación de la glucosa (Atlas, 1993). Ya sabiendo que los microorganismos obtenidos de la mariponasa de *Metamorpho elissa*, *Methona confusa* y *Hamadryas* fue *Klebsiella pneumoniae*, y de *Battus polydomas* fue *Enterobacter cloacae*, se puede indicar que la mariponasa

puede ser usada como biofertilizante, ya que, mediante estudios de investigación se ha demostrado la capacidad de bacterias del género *Enterobacter*, para fijar nitrógeno, este es un elemento indispensable en la conformación de aminoácidos, proteínas y otros componentes esenciales para las plantas. Permanece de manera casi inerte gracias a que posee en su estructura un triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, lo cual impide su aprovechamiento por la mayoría de los seres vivos. Para que las plantas puedan asimilar el nitrógeno molecular (N_2), debe romperse primero el enlace más estable que posee la estructura entre los dos átomos de nitrógeno, de forma que este pueda irse incorporando ya convertido en una molécula menos fuerte, esta acción puede ser realizada por algunos microorganismos como *Acinetobacter calcoaceticus*, los cuales lo reducen y luego lo fijan en formas más asimilables para las plantas, como los iones de amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) (Lara et al., 2013).

En cuanto a *Klebsiella pneumoniae*, esta ha sido reportada biofertilizante, debido a que pertenece a un grupo de bacterias denominado “de vida libre”, o en simbiosis, que habitan la rizosfera, pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de diferentes procesos, como la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la producción de sideróforos y el control de fitopatógenos del suelo (Torriente, 2010).

Los microorganismos más estudiados pertenecen a los géneros *Azotobacter*, *Stenotrophomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, entre otros; estos se denominan bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), algunos PGPR transforman el nitrógeno atmosférico en amonio (proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno) para que pueda ser incorporado a la biósfera, lo cual representa un beneficio económico y reduce el impacto negativo en el ambiente, debido al uso exagerado de insumos químicos en la producción agrícola (Thomson, 2003).

Conclusiones

El estudio demuestra que la mariponasa tiene un alto potencial como fuente de nutrientes para la agricultura orgánica. Si bien es necesario realizar más investigaciones para optimizar su uso y evaluar su viabilidad a gran escala, los resultados obtenidos sugieren que este tipo de fertilizante podría ser una opción interesante para agricultores interesados en prácticas sostenibles.

Al realizar las pruebas tanto microbiológicas como bioquímicas en el laboratorio, fue posible obtener la presencia de un organismo en particular, *Klebsiella pneumoniae*, como organismo nitrificante presente en las heces de las especies *Hamadryas*, *Methona confusa* y *Metamorpho elissa*.

Gracias a los resultados obtenidos de la especie *Battus polydamas* se concluyó que la mariponasa se puede implementar como biofertilizante gracias a la capacidad fijadora de la bacteria (*Enterobacter cloacae*) encontrada en las heces.

Recomendaciones

Es recomendable realizar una mayor cantidad de pruebas bioquímicas en la bacteria, para poder obtener de una manera más certera la caracterización microbiana de la mariponasa para cada una de las especies estudiadas.

De igual manera, se recomienda sembrar la muestra de mariponasa en una mayor cantidad de medios de cultivos selectivos, para poder determinar más eficazmente la flora microbiana presente en esta, y verificar si puede llegar a tener algún otro beneficio como biofertilizante en el suelo que se está colonizando, además de ser capaz de fijar el nitrógeno.

Se sugiere realizar investigaciones respecto a la producción y escalamiento de las bacterias presentes en la mariponasa, para ser usadas a nivel agroindustrial.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Corporación Universitaria del Meta - UNIMETA, por el apoyo institucional al desarrollo logístico de esta investigación.

Referencias

- Akhi, M. T., Ostadgavahi, A. T., Ghotaslou, R., Asgharzadeh, M., Pirzadeh, T., Sowmesarayi, V. S., & Memar, M. Y. (2015). Detection, Virulence Gene Assessment and Antibiotic Resistance Pattern of O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Tabriz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(11), <https://doi.org/10.5812/jjm.25317>.
- Atlas, R. M. (1993). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton: CRC Press.
- Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J., & Burmeister, D. M. (2016). An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. *BMC Research Notes*, 9 (1), 1 - 10. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1902-0>.
- Clark, D. P., Martinko, J. M., Madigan, M. T., & Dunlap, P. V. (2009). *Brock. biología de los microorganismos*. España: Editorial Pearson.
- Daniel, A., Adewale, O., Fadaka, Gokul, A., Bakare, O., Aina, O., Fisher, S., Burt, A., Mavumengwana, V., Keyster, M., & Klein, A. (2022). Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety. *Microorganisms*, 10, 1220. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>.
- Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2013). Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51 (1), 97-110.
- Gurusinghe, S., Brooks, T. L., Barrow, R. A., Zhu, X., Thotagamuwa, A., Dennis, P. G., Gupta, V. V. S. R., Vanniasinkam, T., & Weston, L. A. (2019). Technologies for the Selection, Culture and Metabolic Profiling of Unique Rhizosphere Microorganisms for Natural Product Discovery. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(10), 1955. <https://doi.org/10.3390/molecules24101955>.
- Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 95, 5-169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.
- Kumar, A., Moond, V., Choudhari, R., Badekhan, A., Tejasree, P., Baral, K., & Bharti, R. (2024). Optimizing Bio-fertilizers to Address Food Security and Advance Nutritional Sustainability. *Journal of Experimental Agriculture International*, 45 (2). <https://doi.org/10.9734/JEAI/2023/v45i122284>.
- Kumar, S., Panghal, V. P., Narender, & Kumar, S. (2023). Effect of Organic Manures and Natural Farming on Soil Properties and Nutrient Uptake by Carrot. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35 (21), 1172-1177. <https://doi.org/10.9734/ijps/2023/v35i214089>.
- Lara, C., Sanes, S. C., & Oviedo, L. E. (2013). Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). *Bioteología Aplicada*, 30 (4), 271-275.
- Lara, C. L., Villalba, M., & Oviedo, L. E. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX (2), 6-14.
- Mehata, D., Kattel, I., Sapkota, P., Ghimire, N., & Mehta, R. (2023). Biofertilizers: A sustainable strategy for organic farming that would increase crop production and soil health. *Plant Physiology and Soil Chemistry*, 3, 49-53. <https://doi.org/10.26480/ppsc.02.2023.49.53>.
- Mosavian, M., & Koraei, D. (2016). Molecular Detection of IMP Carbapenemase-Producing Gram-Negative

- Bacteria Isolated From Clinical Specimens in Ahvaz, Iran. *Jentashapir Journal of Health Research*, 7(6). <https://doi.org/10.17795/jjhr-36394>.
- Nour El-Din, M., & Salem, A. (2015). Response of two wheat varieties to biofertilization and organic agriculture system on yield and infestation with *Rhizopertha dominica* during storage. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 6 (1), 73-84. <https://doi.org/10.21608/jppp.2015.53079>.
- Qiu, Z., Paungfoo-Lonhienne, C., Ye, J., Gonzalez, A., Petersen, I., Di Bella, L., Hobbs, R., Ibanez, M., Heenan, M., Wang, W., Reeves, S., & Schmidt, S. (2022). Biofertilizers can enhance nitrogen use efficiency of sugarcane. *Environmental Microbiology*, 24(8), 3655-3671. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16027>.
- c, R., & Babalola, O. (2021). Utilization of Microbial Consortia as Biofertilizers and Biopesticides for the Production of Feasible Agricultural Product. *Biology*, 10 (11), 1111. <https://doi.org/10.3390/biology10111111>.
- Silva, F., & Martínez, T. P. (2018). Complejo *Enterobacter cloacae*. *Revista Chilena de Infectología*, 35 (3), 297-298. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000300297>.
- Talwar, D., Singh, K., & Singh, J. (2017). Effect of biofertilizers on soil microbial count, nutrient availability and uptake under november sown onion. *Journal of Applied and Natural Science*, 9 (1), 55- 59. <https://doi.org/10.31018/jans.v9i1.1149>.
- Thomson, K. (2003). World agriculture: Towards 2015/2030. *Land Use Policy*, 20, 375. [https://doi.org/10.1016/S0264-8377\(03\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0264-8377(03)00047-4).
- Torriente, D. (2010). Revisión bibliográfica. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 19-26.

Ciencia y Tecnología Agropecuaria es una revista publicada por la Universidad de Pamplona bajo la licencia: [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) (CC BY-NC-SA 4.0)

