



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de una estrategia de valorización de ácidos grasos para la producción de comunidades microbianas diazótrofes con potencial biofertilizante

Andrés Nicolás Rodríguez Romero

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Agronomía

Palmira, Colombia

2024

Evaluación de una estrategia de valorización de ácidos grasos para la producción de comunidades microbianas diazótroficas con potencial biofertilizante

Andrés Nicolás Rodríguez Romero

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Ph.D. Janeth Sanabria Gómez

Codirector:

Ph.D. Daniel Uribe Vélez

Línea de Investigación:

Suelos y Aguas

Grupo de Investigación:

Microbiología y Biotecnología Ambiental – Universidad del Valle

Microbiología Agrícola – Instituto de Biotecnología UNAL Bogotá

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Agronomía

Palmira, Colombia

2023

Con gratitud y admiración, dedico este trabajo a la maravillosa naturaleza y al desconocido universo microbiano que, a través de sus intrincadas interacciones y biodiversidad, sigue siendo una fuente inagotable de estudio y asombro en la búsqueda de soluciones sostenibles para nuestro mundo

Declaración de obra original

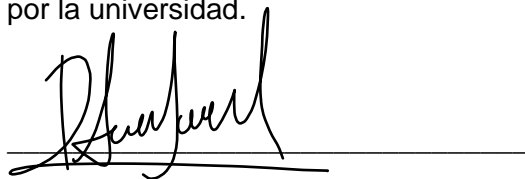
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Andrés Nicolás Rodríguez Romero', is written over a horizontal line.

Andrés Nicolás Rodríguez Romero

Fecha 31/01/202

Resumen

La agricultura actual usa cerca de 100 millones de toneladas anuales de fertilizantes nitrogenados para sostener la demanda alimentaria mundial; la producción de estos fertilizantes y su aplicación en campo ha causado efectos ambientales considerables. Por otra parte, la producción de alimentos también viene asociada con la producción de millones de toneladas anuales de residuos agroindustriales. Se han propuesto alternativas de solución para estas problemáticas basadas en: la teoría ecológica de comunidades microbianas, la ingeniería de bioprocesos y la valorización de residuos agroindustriales con el fin de producir biofertilizantes. En este estudio, nuestro objetivo fue utilizar la bioprospección dirigida centrada en microbiomas, para cultivar comunidades microbianas diazótroficas. Esto se logró mediante el enriquecimiento de muestras de suelo en biorreactores que suministran nitrógeno mediante bombeo de aire y son alimentadas con ácidos grasos volátiles como fuente de carbono. Los resultados muestran que a través de un proceso de selección microbiana se puede obtener una comunidad microbiana diazótropa capaz de fijar 2,7 veces más nitrógeno que el inóculo de partida. Dicha comunidad es capaz de crecer usando ácidos grasos volátiles provenientes de residuos como fuente de carbono. Durante el proceso de cultivo se pueden obtener formas inorgánicas de nitrógeno en el sobrenadante en concentraciones que alcanzan $12,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. La comunidad microbiana diazótropa crecida en biorreactores, cuyos tres géneros más abundantes son *Sinirhodobacter* sp. (44,4%), *Aureimonas* sp. (17,7%) y *Taibaiella* sp. (12,4%); es capaz de promover el crecimiento de plantas de tomate tanto en hidroponía como en suelo. Alcanzando una altura y producción igual a la obtenida usando fertilizantes nitrogenados de síntesis química con aporte completo de nitrógeno. Se evidencia el potencial de la metodología para hacer crecer una comunidad microbiana diazótropa con potencial biofertilizante. La sencillez de funcionamiento del reactor y la capacidad de operar con fuentes de carbono provenientes del tratamiento de residuos agroindustriales hace que su aplicación sea prometedora para los países en desarrollo con bajo progreso tecnológico

Palabras clave: nitrógeno, fijación biológica de nitrógeno, comunidades auto ensambladas, promoción de crecimiento vegetal

Abstract

Assessment of a Strategy for Valorization of Fatty Acids in the Production of Diazotrophic Microbial Communities with Biofertilizer Potential

Current agriculture utilizes approximately 100 million tons of nitrogen fertilizers annually to sustain global food demand, yet their production and application have led to significant environmental consequences. Additionally, food production generates millions of tons of agro-industrial waste annually. Proposed solutions to these issues involve leveraging ecological theories of microbial communities, bioprocess engineering, and valorization of agro-industrial waste to produce biofertilizers. This study aimed to utilize directed bioprospecting focused on microbiomes to cultivate diazotrophic microbial communities. This was achieved by enriching soil samples in bioreactors that supplied nitrogen through air pumping and were fed with volatile fatty acids as a carbon source. Results demonstrate that through microbial selection, a diazotrophic microbial community capable of fixing 2.7 times more nitrogen than the initial inoculum can be obtained. This community can grow using volatile fatty acids from waste as a carbon source. During cultivation, inorganic forms of nitrogen can be obtained in the supernatant at concentrations reaching 12.7 mg*ml⁻¹. The diazotrophic microbial community grown in bioreactors, with the three most abundant genera being *Sinirhodobacter* sp. (44.4%), *Aureimonas* sp. (17.7%), and *Taibaiella* sp. (12.4%), is capable of promoting tomato plant growth in both hydroponic and soil environments. Achieving height and production equal to that obtained using chemically synthesized nitrogen fertilizers. The potential of this methodology to cultivate a diazotrophic microbial community with biofertilizer potential is evident. The simplicity of reactor operation and the ability to operate with carbon sources from agro-industrial waste treatment make its application promising for technologically underdeveloped countries.

Keywords: nitrogen, biological nitrogen fixation, self-assembled communities, plant growth promotion

Contenido

El presente documento de tesis esta escrito en 5 capítulos. En el capítulo 1 tiene como título el nombre de la tesis y se aborda una introducción general, el problema de investigación, la justificación, la hipótesis y los objetivos. El capítulo 2 se enlaza con el objetivo específico 1 y aborda el enriquecimiento y selección de una comunidad microbiana fijadora de nitrógeno usando Acidos Grasos Volátiles (AGVs) como fuente de carbono. En el capítulo 3 (objetivo específico 2) se muestra el uso de los AGVs provenientes de estiercol de cerdo para cultivar la comunidad microbiana autoensamblada como una opción de valorización de residuos para la producción de biofertilizantes. En el capítulo 4 (objetivo específico 3) se hace la evaluación del potencial biofertilizante de la comunidad microbiana autoensamblada en plantas de tomate. Finalmente el capítulo 5 contiene las consideraciones y recomendaciones finales.

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XVI
Lista de tablas.....	XIX
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	1
1. Capítulo 1: Evaluación de una estrategia de valorización de ácidos grasos para la producción de comunidades microbianas diazótrofes con potencial biofertilizante	3
1.1 Introducción general.....	3
1.2 Problema y justificación.....	5
1.3 Pregunta de investigación e hipótesis	8
1.3.1 Pregunta de investigación.....	8
1.3.2 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general.....	8

1.4.2	Objetivos específicos.....	8
2.	Capítulo 2: Enriquecimiento y selección de una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno capaz de usar ácidos grasos de cadena corta como fuente de carbono	11
2.1	Resumen	11
2.2	Introducción	11
2.3	Materiales y métodos.....	13
2.3.1	Obtención del inóculo inicial	13
2.3.2	Obtención de una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno.....	14
2.3.3	Sistema de reactores usado	16
2.3.4	Variables de seguimiento de los bioreactores	16
2.3.5	Extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático	17
2.3.6	Análisis estadístico.....	17
2.4	Resultados.....	17
2.5	Discusión	22
2.6	Conclusiones	26
3.	Capítulo 3	27
3.1	Resumen	27
3.2	Introducción	27
3.3	Materiales y métodos.....	29
3.3.1	Obtención de los AGVs	29
3.3.2	Evaluación de los AGVs como fuente de carbono para cultivar una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno	29
3.3.3	Extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático	32
3.3.4	Análisis estadístico.....	32
3.4	Resultados.....	33
3.5	Discusión	37
3.6	Conclusiones	39
4.	Capítulo 4: Potencial biofertilizante de comunidades microbianas autoensambladas fijadoras de nitrógeno en plantas de tomate.....	41
4.1	Resumen	41
4.2	Introducción	41
4.3	Materiales y métodos.....	43
4.3.1	Montaje experimental en hidroponía.....	43
4.3.2	Montaje experimental en invernadero.....	45
4.3.3	Variables de respuesta.....	48
4.3.4	Extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático	48
4.3.5	Análisis estadístico.....	50
4.4	Resultados.....	50
4.4.1	Plantas crecidas en hidroponía	50
4.4.2	Plantas crecidas en invernadero	53
4.4.3	Microbioma rizosférico.....	56
4.5	Discusión	57
4.6	Conclusiones	60

5. Recomendaciones y consideraciones finales63

Bibliografía67

Lista de figuras

• Capítulo 2

Figura 1: Montaje experimental usado para la obtención de una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno. A1: obtención del inóculo inicial a partir de suelo Xvliorreactor de diferentes especies de plantas. A2: Fase de enriquecimiento usando la fuente de nitrógeno y fuente de carbono como factor de selección ecológica. A3: Fase de selección de una comunidad microbiana autoensamblada con mayor capacidad de fijación de nitrógeno. B: sistema de reactor usado. TRH: tiempo de retención hidráulica..... **13**

Figura 2: Densidad óptica (curvas discontinuas) y pH (triángulos) para cada una de las 6 alimentaciones sucesivas en la fase de enriquecimiento. AGVs: ácidos grasos volátiles, Glu-Man: mezcla de glucosa y manitol. N=3..... **16**

Figura 3. Variables fisicoquímicas en la fase de selección medidas a los 28 días de operación de los reactores. AGVs: ácidos grasos volátiles, Glu-Man: mezcla de glucosa y manitol. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas de nitrógeno total entre las diluciones (ANOVA -Tukey $p < 0,05$). * grises indican diferencias estadísticamente significativas en concentración de AGVs respecto al control no inoculado (ANOVA-Dunnet $p < 0,05$). * blancos indican diferencias estadísticamente significativas en pH respecto a pH 7 (ANOVA-Dunnet $p < 0,05$). n=3..... **16**

Figura 4. Abundancia relativa a nivel de Familia para el inóculo Xvliorreactorico (IR) y las diluciones obtenidas en la etapa de selección a los 28 días de operación de los reactores alimentados con AGVs. Los taxones resaltados corresponden a los más abundantes para cada phylum. n=3..... **17**

Figura 5. Abundancia relativa a nivel de genero para el inóculo Xvliorreactorico (IR) y las diluciones obtenidas en la etapa de selección a los 28 días de operación de los reactores alimentados con AGVs. Los taxones resaltados corresponden a los más abundantes para cada phylum. n=3..... **18**

Figura 6. Gráfico de calor con valores de abundancia relativa de los 20 géneros más abundantes en las muestras. Tonos rojos más intensos indican una alta abundancia y menos intensos una baja abundancia. IR: inóculo Xvliorreactorico. n=3..... **19**

Figura 7. Valor promedio de los índices de alfa diversidad. IR: inócuXVIIiorreactorico.....19

Figura 8. Matriz de correlación de Pearson de las abundancias a nivel de género y variables fisicoquímicas. Elipses azules indican correlaciones positivas y elipses rojas indican correlaciones negativas. Las elipses en recuadros grises indican correlaciones significativas ($p < 0,05$).....21

• Capítulo 3

Figura 1. Esquema experimental usado para la evaluación de una mezcla de AGVs proveniente de estiércol de cerdo como fuente de carbono para alimentar una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno. A: obtención de los AGVs a partir del estiércol de cerdo, B: comparación de los AGVs de cerdo con otras fuentes de carbono, C: sistema de biorreactoresres usado.....28

Figura 2. Variables fisicoquímicas medidas durante 28 días. A: densidad óptica, B: pH, C: Nitrógeno total en la biomasa, D: Nitrógeno total en el sobrenadante. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas en el día 28 (ANOVA-Tukey $p < 0,05$).....31

Figura 3. Concentración de AGVs en el día 0 y el día 28. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas en el día 28 (ANOVA-Tukey $p < 0,05$).....32

Figura 4. Abundancia relativa a nivel de Genero para el inócuXVIIiorreactorico (IR), la mezcla de AGVs sintética (MS) y la mezcla de AGVs de cerdo (MC) a los 28 días de operación de los reactores. Los taxones resaltados corresponden a los géneros más abundantes para cada phylum.....33

Figura 5. Índices de alfa diversidad. Figura 5. índices de alfa diversidad.....34

Figura 6. Gráfico de calor con valores de abundancia relativa de los 20 géneros más abundantes en las muestras. Tonos rojos más intensos indican una alta abundancia y menos intensos una baja abundancia. IR: inócuXVIIiorreactorico. MC: mezcla de AGVs de cerdo, MS: mezcla de AGVs sintética.....35

• Capítulo 4

Figura 1. Esquema experimental para el ensayo en hidroponía (A) y en invernadero (B). NITRO: aplicación de nitrógeno mediante solución de Hoagland, AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter* y *Azospirillum*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del efluente del reactor donde se cultivó la comunidad microbiana

autoensamblada fijadora de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar.....43

Figura 2. Mediciones en plantas de tomate de 45 días de crecimiento en hidroponía. A: longitud del tallo, B: número de hojas. C: longitud de la raíz, D: peso fresco de la planta, E: contenido de clorofilas. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey $p < 0,05$).....49

Figura 3. Fotografías de plantas de tomate de 45 días de crecimiento en hidroponía.....50

Figura 4. Fotografías microscópicas de raíces de plantas de tomate del control negativo sin aporte de nitrógeno (A) y plantas inoculadas con la biomasa resuspendida en solución salina (B-C-D).....51

Figura 5. Producción en peso fresco de los frutos de tomate a los 45 DDS. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey $p < 0,05$).....52

Figura 6. Fotografías de plantas de tomate de los diferentes tratamientos crecidas en invernadero a los 35 DDS. AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter* y *Asospirillum*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del reactor fijador de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar, NE: suelo no esterilizado, E: suelo esterilizado.....53

Figura 7. Altura de la planta durante el tiempo de evaluación del experimento (A) y a los 70 DDS (B). Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey $p < 0,05$). AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter* y *Asospirillum*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del reactor fijador de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar.....54

Figura 8. Gráfico de calor con valores de abundancia relativa de los 42 géneros más abundantes en las muestras. Tonos rojos mas intensos indican una alta abundancia y menos intensos una baja abundancia. IR: inócuXVIIIiorreactorico. MC: mezcla de AGVs de cerdo, AZO: mezcla de AGVs sintética, AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter* y *Asospirillum*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del reactor fijador de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar.....55

Lista de tablas

Capítulo 1

Tabla 1. Variaciones en la fuente de carbono evaluadas para la fase de enriquecimiento y selección.....	13
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Capítulo 2

Tabla 1. Tratamientos evaluados y concentraciones de las fuentes de carbono.....	29
-----------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Capítulo 3

Tabla 1. Descripción de los tratamientos y forma de aplicación.....	42
----------------------------------------------------------------------------	-----------

Tabla 2. Descripción de los tratamientos y forma de aplicación.....	44
----------------------------------------------------------------------------	-----------

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura/símbolo	Término
AGVs	Ácidos Grasos Volátiles
HB	Haber Bosh
DA	Digestión Anaerobia
μl	Microlitro
B	Beta
ANOVA	Análisis de Varianza

1. Capítulo 1: Evaluación de una estrategia de valorización de ácidos grasos para la producción de comunidades microbianas diazótrofes con potencial biofertilizante

1.1 Introducción general

Para el 2022 se produjeron 9,6 billones de toneladas de alimentos a nivel mundial (FAOSTAT, 2^a23a), para el 2050 se espera que esta cifra aumente en un 70% (FAOSTAT, 2^a23a). A nivel agrícola tanto para la producción de consumo humano como animal, uno de los principales insumos son los fertilizantes, donde el nitrógeno es el nutriente más importante (Móring et al., 2021). El nitrógeno que se usa en la agricultura se puede obtener a partir de la mineralización de fuentes orgánicas ya sean de origen vegetal o animal (Zhang et al., 2021).

Este aporte no es suficiente para sustentar la producción de los cultivos (Zhang et al., 2021). Por lo que se hace necesario usar fuentes de síntesis química que extraen el nitrógeno de la atmósfera (Fúnez Guerra et al., 2020), de esta forma cerca del 80% del nitrógeno que se usa en la agricultura proviene de la síntesis química mediante la reacción de Haber Bosh (HB) (Galloway et al., 2021). Usando este proceso, para el 2021 se produjeron cerca de 108 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados, cifra que sigue en aumento debido a la creciente demanda de alimentos (FAOSTAT, 2023b). HB es un proceso que demanda entre 20 y 30 GJ*ton de NH₃⁻¹ que se obtiene a partir de fuentes no renovables (Fúnez Guerra et al., 2020) y genera cerca del 2% de las emisiones globales de gases efecto invernadero (Galloway et al., 2021).

Se ha explorado la fijación biológica de nitrógeno realizada por microorganismos como estrategia para mitigar los impactos de los fertilizantes químicos. En este sentido, existe

una variedad de inoculantes microbianos que se venden actualmente como fijadores de nitrógeno (Joshi & Gauraha, 2022). A pesar de que el mercado mundial de biofertilizantes microbianos está creciendo (Joshi & Gauraha, 2022), su aplicación es todavía baja en comparación con los fertilizantes químicos (Aloo et al., 2021). Esto debido a que se mantienen algunas limitaciones en su producción, formulación y aplicación.

En primer lugar, la mayoría de los biofertilizantes nitrogenados se basa en aislamientos puros en su mayoría con *Rizhobium* como ingrediente activo (Aloo et al., 2021), esto ha hecho que este tipo de desarrollos solo funcionen en un número de cultivos restringido como las leguminosas. En segundo lugar, el otro porcentaje de los biofertilizantes está desarrollado a partir de aislamientos puros cuya efectividad a nivel de campo es limitada (Joshi & Gauraha, 2022). Finalmente, la producción a gran escala de estos productos sigue siendo costosa debido a que se requieren unas condiciones controladas y fuentes nutricionales costosas para poder cultivar estos microorganismos (Ben Rebah et al., 2007; Sansinenea, 2021).

Ante esta situación, considerando las bases teóricas de la ecología de comunidades microbianas, la ingeniería de bioprocesos para cultivos microbianos y el creciente interés por los microbiomas terrestres, Se propone la producción 4iorreactoresres de comunidades microbianas auto ensambladas, utilizando diferentes tipos de presión selectiva (Gutierrez et al., 2020).

Como parte de la investigación del grupo GAOX, usando reactores operados en flujo continuo, se logró demostrar a nivel experimental que se pueden cultivar exitosamente comunidades microbianas fijadoras de nitrógeno, que una vez inoculados en plantas de cilantro se logra un crecimiento igual o cercano al obtenido usando nitrógeno de síntesis química (Rodriguez-Gonzalez et al., 2021). Para el caso específico de tomate, plantas inoculadas con el efluente 4iorreactoresres alimentados con ácido cítrico como fuente de carbono alcanzaron el mismo crecimiento que el obtenido con el fertilizante de síntesis química (Gutiérrez et al., 2022). Sin embargo, su aproximación práctica sigue siendo costosa debido a que es necesario usar ácido cítrico de origen industrial. Además, usar un reactor operado en continuo aumenta los costos de producción.

Los residuos orgánicos son una fuente alternativa de fuentes de carbono de bajo costo. Entre las opciones de uso y adición de valor agregado se encuentra la digestión anaerobia (Clavijo-Salinas et al., 2020), cuyos productos finales son el biogás, una fase sólida rica en nutrientes y una fase líquida que contiene ácidos grasos volátiles (AGVs), también conocidos como ácidos grasos de cadena corta (Harirchi et al., 2022).

Los AGVs son moléculas carbonadas de bajo peso molecular (Harirchi et al., 2022). El interés en este tipo de compuestos radica en que se pueden obtener como un subproducto de la digestión anaerobia y tienen un alto potencial de aprovechamiento debido a que son precursores metabólicos en varios procesos celulares (Agnihotri et al., 2022). Se ha demostrado su uso como materia prima para la obtención de diferentes tipos de bioproductos como polihidroxialcanoatos, biocombustibles, biogás, hidrógeno y otras moléculas como ésteres, cetonas y alcanos (Agnihotri et al., 2022). Se estima que actualmente se producen cerca de 250.000 millones de litros de efluentes de digestores anaerobios en el mundo. Esto representa miles de kilogramos de ácidos grasos potencialmente aprovechables que no se aprovechan como un subproducto con valor agregado (Agnihotri et al., 2022) y cuya recuperación podría reemplazar fuentes de carbono costosas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente dicho, el presente trabajo busca evaluar una estrategia de valorización de ácidos grasos volátiles provenientes de residuos de la industria porcícola para la producción de comunidades microbianas diazótrofes con potencial biofertilizante.

1.2 Problema y justificación

El nitrógeno es uno de los macronutrientes más importante para la vida y constituye el elemento en mayor proporción dentro de los planes de fertilización de cultivos (FAO, 2022b). La única reserva natural accesible de nitrógeno que existe sobre la superficie de la tierra es el nitrógeno atmosférico (González-Andrés & James, 2016). Aunque se encuentra de manera abundante en la atmósfera (78%), esta reserva no puede ser directamente utilizada por la mayoría de los seres vivos. Solamente las bacterias y algunas

arqueas conocidas como fijadores biológicos de nitrógeno son capaces de transformar el nitrógeno gaseoso de la atmósfera en formas de nitrógeno combinado (Wang et al., 2021). Existe un método antropogénico para fijar nitrógeno atmosférico, sin embargo, a un costo energético y ambiental muy alto. Este proceso es conocido como la reacción de Haber Bosh. HB requiere una temperatura de funcionamiento de 400 a 500 °C y una presión superior a 100 bar para convertir N_2 y H_2 en NH_3 (Smith et al., 2020). Por una tonelada de amonio generada se produce promedio global de 2,9 toneladas de dióxido de carbono y se consume 30 GJ de energía aportados a través de la combustión de metano (Bicer et al., 2017). Alrededor del 1,6% de la oferta global de combustibles fósiles se emplean para la producción de amonio mediante HB (Fúnez Guerra et al., 2020).

A nivel mundial, se esperaba que la demanda de fertilizantes nitrogenados alcanzara los 112 millones de toneladas para apoyar la producción de alimentos para alrededor de 8 mil millones de personas que dependen de estos. Sin embargo, estas cifras fueron superadas en el 2020, produciéndose aproximadamente 11.774 millones toneladas de alimentos de origen vegetal, lo que requirió de 113 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados (FAOSTAT, 2023b) producidos mediante HB. Además, de las problemáticas ambientales antes mencionadas, hay un problema económico mundial y es que a raíz de la pandemia generada por el COVID-19 y los conflictos geopolíticos entre Rusia y Ucrania, la oferta de gas natural, principal fuente energética usada en HB se ha disminuido (Geng et al., 2021), lo que hace que se incrementen de manera drástica los precios de los fertilizantes.

Para el caso de Colombia, desde el 2020 hasta agosto del 2022 se han registrado aumentos en más del 300% en los precios para los fertilizantes nitrogenados y en general para todo tipo de fertilizantes (DANE, 2023). Este problema genera como consecuencias una menor obtención de utilidades para los productores agropecuarios y aumento en los precios de los alimentos para los consumidores. Otra consecuencia es que muchos sistemas de producción agrícola deben parar su producción porque dejan de ser rentables y el país se ve en la obligación de importar alimentos para suplir la demanda (FAOSTAT, 2022). A nivel mundial se habla de un aumento promedio del 70% en los precios de los fertilizantes (FAO, 2022b).

Los biofertilizantes se han venido usando desde hace varios años como alternativa a la fertilización de síntesis química, sin embargo, al revisar el mercado actual, los productos a

base de bioinoculantes solo representan un 5% de consumo frente a los fertilizantes convencionales (Bonilla Buitrago et al., 2021), esto permite concluir que estas alternativas biotecnológicas siguen manteniendo limitaciones que no les permiten un uso extendido. Algunas de las limitaciones que aún se mantienen son los altos costos asociados a las fuentes nutricionales usadas para el crecimiento de los microorganismos (Ben Rebah et al., 2007; Suthar et al., 2017).

La producción industrial de *Rizhobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter* usa fuentes de carbono como sacarosa, ácido málico, manitol y glucosa que representan aproximadamente el 54% de los costos variables de producción (Amaresan et al., 2023; Sethi & Adhikary, 2012). Es por esto que se hace necesario explorar el uso de fuentes nutricionales que sean menos costosas en el proceso de producción y que su obtención a su vez no genere residuos adicionales, sino que por el contrario pueda contribuir a resolver otros problemas como es el caso de los residuos agroindustriales.

La gestión de residuos orgánicos agroindustriales es un desafío imperante en el ámbito agrícola e industrial (FAO, 2019), donde el aumento exponencial de la producción de residuos no solo refleja la expansión de estas actividades, sino también la ausencia de estrategias idóneas para su tratamiento y aprovechamiento eficiente (FAO, 2019). Anualmente se generan 55 billones de toneladas de residuos de origen animal (Giroto & Cossu, 2017). Este tipo de residuos merecen atención especial debido a que por su alto contenido de humedad liberan CO₂ (3,5 billones de toneladas de CO₂eq en 2018), amoníaco (60 millones de toneladas en 2018) y otros contaminantes, contribuyendo al efecto invernadero y contaminación de fuentes de agua (FAO, 2020). El uso de la digestión anaerobia como opción de manejo y valoración de este tipo de residuos se ha venido usando desde hace muchos años enfocada en la producción de biogás, dejando de lado la fase sólida y la fase líquida del efluente que normalmente se convierten en un desecho más (Kranert et al., 2012). La fase líquida puede llegar a contener concentraciones considerables de moléculas orgánicas con alto potencial de valorización como los AGVs (Wainaina et al., 2019). Los AGVs provenientes del tratamiento anaerobio de residuos se han usado como materia prima para la obtención de diferentes tipos de bioproductos como polihidroxicanoatos, biocombustibles, biogás, hidrógeno y otras moléculas como ésteres, cetonas y alcanos (Agnihotri et al., 2022).

La fijación de nitrógeno se ha propuesto como otra opción de valorización de los AGVs (Clavijo-Salinas et al., 2020). Estudios recientes han mostrado que algunos microorganismos son capaces de usar acetato como fuente de carbono para el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Jing et al., 2022; Wang et al., 2017). Sin embargo, no se ha explorado el uso de otro tipo de AGVs que puedan ser útiles para cultivar microorganismos diazótrofos para producir biofertilizantes.

1.3 Pregunta de investigación e hipótesis

1.3.1 Pregunta de investigación

¿Es posible obtener una comunidad microbiana fijadora de nitrógeno que se capaz de usar ácidos grasos volátiles como fuente de carbono y que pueda ser usada como biofertilizante?

1.3.2 Hipótesis

Se hipotetiza que es factible obtener una comunidad microbiana fijadora de nitrógeno que posea la capacidad metabólica para utilizar ácidos grasos volátiles como fuente de carbono. Esta comunidad microbiana, una vez desarrollada y probada, podría ser utilizada exitosamente como biofertilizante, promoviendo la fijación de nitrógeno en el suelo y contribuyendo así al incremento de la productividad de cultivos agrícolas

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar una estrategia de valorización de ácidos grasos provenientes de residuos de la industria porcícola para la producción de comunidades microbianas diazótrofes con potencial biofertilizante

1.4.2 Objetivos específicos

Obtener una comunidad microbiana autoensamblada con fijadores de nitrógeno que pueda usar ácidos grasos volátiles como fuente de carbono

Evaluar el uso de ácidos grasos volátiles provenientes de estiércol de cerdo como fuente de carbono para producir una comunidad microbiana autoensamblada con fijadores de nitrógeno

Examinar el potencial biofertilizante de las comunidades microbianas diazótrofes alimentadas con ácidos grasos volátiles provenientes de estiércol de cerdo como fuente de carbono

2. Capítulo 2: Enriquecimiento y selección de una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno capaz de usar ácidos grasos de cadena corta como fuente de carbono

2.1 Resumen

La fijación biológica de nitrógeno es el segundo proceso biológico más importante para mantener la vida en el planeta. Se han logrado aislar microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre desde diferentes ambientes para desarrollar biofertilizantes. Las comunidades autoensambladas fijadoras de nitrógeno pueden ser más ventajosas para producir biofertilizantes. En este trabajo usamos una estrategia de enriquecimiento microbiano a partir de una muestra de suelo conocida como “top-down” para obtener una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno capaz de usar ácidos grasos volátiles (AGVs) como fuente de carbono. Los resultados muestran que la comunidad autoensamblada aumenta un 76% la capacidad de fijación de nitrógeno con respecto al inóculo inicial y se evidencia un consumo significativo de AGVs. Usando secuenciación Illumina dirigida al 16s rRNA se determinó que los 6 taxones más abundantes de la comunidad autoensamblada fueron *Gordonia* sp. (34,7%), Unclassified_1 (31%) y Unclassified_3 (8%), Unclassified_2 (4,2%), *Pseudoxanthomonas* sp. (3,6%) y *Gluconoacetobacter* sp. (4,6%). Algunos de ellos aun no clasificados y poco estudiados, pero con potencial para usarse como inoculantes.

2.2 Introducción

Los microorganismos en la naturaleza nunca trabajan ni conviven solos. Forman comunidades con estrechas relaciones entre sus miembros que les permiten colonizar casi

cualquier nicho (Xu et al., 2020). Bajo la evidencia reciente que muestra que pensar en desarrollos biotecnológicos basados en comunidades microbianas puede ser más ventajoso que seguir usando aislamientos puros (Gutierrez et al., 2020). Han emergido nuevas líneas de investigación como la ingeniería de microbiomas, cuyo objetivo es aprovechar el conocimiento científico fundamental y el diseño cuantitativo para crear microbiomas que realicen las funciones deseadas (Lawson et al., 2019). En términos prácticos, lo que se busca es integrar la teoría ecológica de comunidades microbianas con la ingeniería de bioprocesos para diseñar y operar biorreactores que fomenten el desarrollo de comunidades microbianas específicas que puedan realizar las funciones deseadas (Gutierrez et al., 2020).

Debido a la alta complejidad y la comprensión limitada de los procesos del microbioma a escala molecular, el diseño del microbioma ha seguido convencionalmente un enfoque “top-down” (Lawson et al., 2019). Este enfoque intenta predecir cómo los controles a nivel del ecosistema pueden crear un microbioma con las funciones deseadas partiendo de un microbioma inicial (Diaz-Colunga et al., 2022). Esta aproximación elimina la necesidad de elegir una cepa o una ruta metabólica en particular, lo que se busca es usar variables ambientales seleccionadas (tasas de carga de sustrato, tiempos de retención celular o disponibilidad de nutrientes) que fuerzan un microbioma existente a través de la selección ecológica para realizar los procesos biológicos deseados (Tobias-Hünefeldt et al., 2021). Al final del proceso, se obtienen comunidades autoensambladas. El término autoensamble se refiere a que son los mismos microorganismos quienes deciden con qué otros microorganismos asociarse para responder a las condiciones que se han establecido como factor de selección (Gutierrez et al., 2020). Esto significa que se aprovechan las asociaciones naturales entre los microorganismos.

A nivel experimental, se han logrado construir comunidades microbianas autoensambladas fijadoras de nitrógeno usando como variable de selección la fuente de nitrógeno (Gutiérrez et al., 2022), y se ha evidenciado el papel de estas comunidades como inoculantes en tomate para suplir la demanda de nitrógeno de las plantas. Pero hay otro factor de selección que podría evaluarse como las fuentes de carbono. Los dos átomos de nitrógeno están unidos por un triple enlace muy estable que requiere mucha energía (945 kJ, o 226 kcal mol⁻¹) para romperse y ahí radica uno de los principales desafíos de la fijación biológica del nitrógeno (Zuberer, 2021). Normalmente en las 14 décadas que se ha

estudiado la fijación biológica de nitrógeno, se han usado unas pocas moléculas como fuente de energía (glucosa, sacarosa, ácido málico, manitol), valdría la pena explorar otras opciones que puedan ser más eficientes energéticamente hablando como los ácidos grasos volátiles (AGVs) que se describen en el capítulo 1.

Desde un punto de vista teórico, los microorganismos fijadores de nitrógeno podrían metabolizar los AGVs para obtener el ATP necesario para catalizar la fijación del N_2 . Los AGVs entrarían a la ruta de la β -oxidación para producir Acetil-CoA, la cual entra al ciclo de Krebs para producir ATP (Fujita et al., 2007). La cantidad de ATP que se obtiene de cada ácido graso va a depender del número de carbonos que contenga (Fujita et al., 2007). Este trabajo busca obtener una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno usando como factor de selección ecológica la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Obtención del inóculo inicial

Se tomó como inóculo inicial el suelo rizosférico de plantas de yuca, plátano, sábila y pasto brachiaria de la finca “cañabravas” vereda San José, municipio del Darién, Valle del Cauca, Colombia ($3^{\circ}53'12.9''N$, $76^{\circ}22'9.2''W$). Corresponde a una finca de agricultura familiar sin historial de aplicación de fertilizantes nitrogenados de síntesis química. El objetivo de usar diferentes especies de plantas corresponde tener una amplia diversidad de partida para el enriquecimiento y selección de la comunidad autoensamblada. El suelo rizosférico fue recolectado siguiendo la metodología de Barillot y colaboradores (2013). Brevemente, se retiraron del suelo 3 plantas de cada especie (12 en total), se agitaron vigorosamente para desprender el suelo de soporte y se seleccionaron las raíces jóvenes con pelos radicales, las cuales fueron cortadas, almacenadas en bolsas plásticas Ziploc a $4^{\circ}C$ para su transporte al laboratorio. Para cada planta se pesaron 100 g de raíces, se mezclaron las raíces de las 4 especies de plantas en un frasco estéril de 1 L, el cual se llenó hasta la mitad con solución salina al 0.85 % y se añadió tween 80 al 0.01 %. Posteriormente, se agitó durante 90 minutos a 300 rpm para desprender el suelo rizosférico y las bacterias del rizoplano. La fase líquida se centrifugó a 150 g durante 10 minutos, el sobrenadante se

filtró (1 mm) y se transfirió a otro frasco estéril. Finalmente, este filtrado se utilizó como inóculo de partida para el proceso de enriquecimiento y selección (figura 1A).

2.3.2 Obtención de una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno

Se utilizó la metodología propuesta por Díaz-García y colaboradores (2021) con algunas modificaciones para la obtención de la comunidad autoensamblada. Se usaron reactores aerobios en semibatch (figura 1B). Para la fase de enriquecimiento (figura 1 A-2), el inóculo rizosférico se cultivó en medio NFB sin aporte de nitrógeno (Rennie, 1981) evaluando tres variaciones en las fuentes de carbono (tabla 1): la primera fue una mezcla de ácido acético (Sigma-Aldrich, USA), ácido propiónico (Sigma-Aldrich, USA) y ácido butírico (Sigma-Aldrich, USA); la segunda fue una mezcla de glucosa y manitol; y en la tercera sin fuente de carbono. Para cada variación de la fuente de carbono se usaron tres replicas. Adicional a las fuentes de carbono, se añadieron otros nutrientes en las siguientes cantidades para 1 L de medio de cultivo: 0.5g K_2HPO_4 , 0.1g NaCl, 0.2g $MgSO_4$, 0.2g KOH, 0.02g $CaCl_2$, 2 mL de solución de micronutrientes y 4 mL de solución Fe-EDTA. Solución de micronutrientes para 200 mL: 0.02g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.235g $MnSO_4$, 0.280 g H_3BO_3 , 0.008 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 0.0024 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Solución de Fe-EDTA para 100 mL: 0.8258 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.556 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$. En ningún tratamiento se adicionaron vitaminas. El pH fue ajustado a 7 para los tres casos. El volúmen efectivo de cada reactor fue de 250 mL. Se realizó una alimentación por lotes con un tiempo de retención hidráulica de 7 días, reemplazando el 99% del contenido del reactor con medio de cultivo estéril. El proceso de alimentación se realizó 6 veces (figura 1A-2). Previo a cada alimentación, se tomaron alícuotas de 5 mL de cada reactor para medición de variables de seguimiento.

Para la fase de selección (Figura 1A-2), se realizaron diluciones en serie del efluente del reactor obtenido en la sexta alimentación. Se usó 1 mL del contenido del reactor en 9 mL de solución salina estéril (0.85%). Se tomaron 2,5 mL de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y se inocularon en reactores con medio NFB estéril con las tres variaciones en la fuente de carbono registradas en la tabla 1. Los reactores se incubaron paralelamente durante 28 días a temperatura ambiente con entrada de aire permanente ($1 L \cdot min^{-1}$) (figura 1A-3). Cada siete días se tomaron alícuotas para medición de variables de seguimiento.

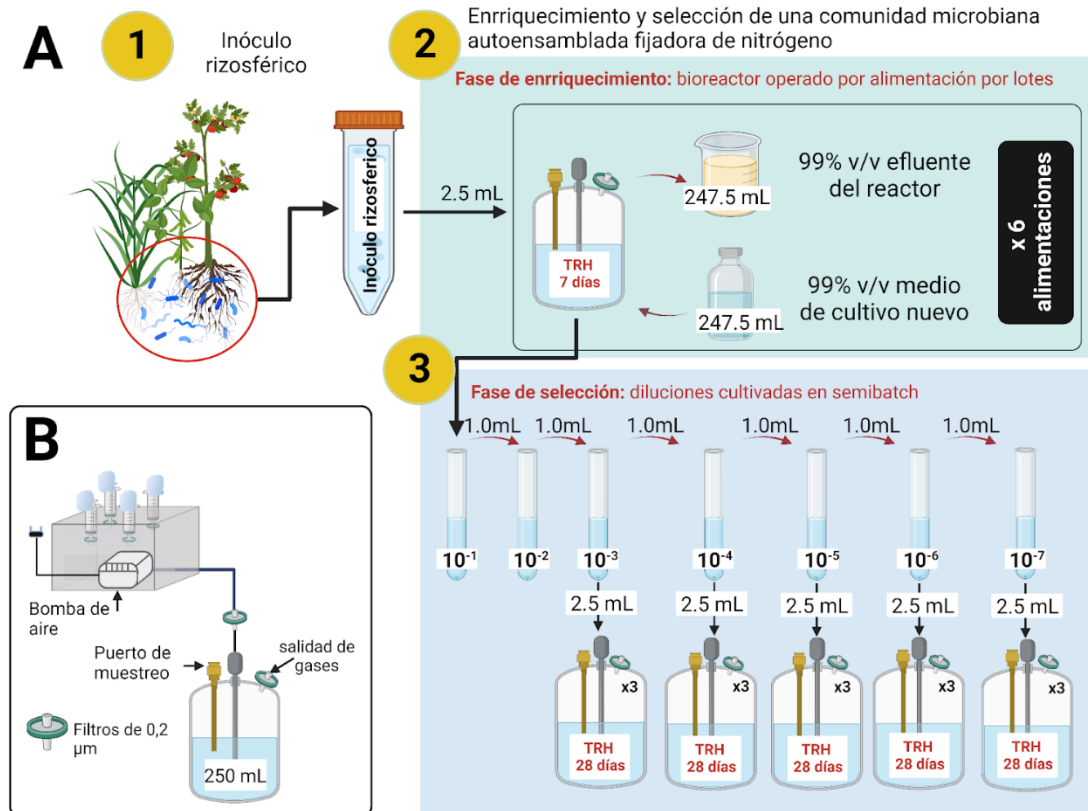


Figura 1. Montaje experimental usado para la obtención de una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno. A1: obtención del inóculo inicial a partir de suelo rizosférico de diferentes especies de plantas. A2: Fase de enriquecimiento usando la fuente de nitrógeno y fuente de carbono como factor de selección ecológica. A3: Fase de selección de una comunidad microbiana. B: Sistema usado para la inyección de aire en los reactores

Tabla 1. Variaciones en la fuente de carbono evaluadas para la fase de enriquecimiento y selección.

Fuente de carbono	Mezcla AGVs sintéticos *	Sin carbono *	Glucosa - manitol *
Ácido acético ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	7,45	0	0
Ácido propiónico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	2,25	0	0
Ácido butírico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,85	0	0
Glucosa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	0	8
Manitol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	0	8

*Adicional a las fuentes de carbono, se añadieron otros nutrientes en las siguientes cantidades para 1 L de medio de cultivo: 0.5g K_2HPO_4 , 0.1g NaCl, 0.2g $MgSO_4$, 0.2g KOH, 0.02g $CaCl_2$, 2 mL de solución de micronutrientes y 4 mL de solución Fe-EDTA. Solución de micronutrientes para 200 mL: 0.02g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.235g $MnSO_4$, 0.280 g H_3BO_3 , 0.008 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 0.0024 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Solución de Fe-EDTA para 100 mL: 0.8258 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.556 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$. El pH del medio fue ajustado a 7.

2.3.3 Sistema de reactores usado

Se usaron reactores en semibatch con mezcla completa (figura 1B). Cada reactor se compone de una botella de vidrio de 500 mL con una entrada de aire permanente ($1 L \cdot min^{-1}$) inyectada por una bomba de aire. La bomba de aire está dentro de una caja hermética de plástico que tiene 4 entradas de aire del ambiente que es filtrado por cilindros de plástico rellenos de algodón antiséptico. Cada bomba inyecta aire a través de una manguera de plástico en los reactores. Antes de ingresar al reactor, cada manguera se conecta a un filtro de tamaño de poro de $0.22 \mu m$, para garantizar condiciones asépticas dentro del reactor. El burbujeo generado por la manguera mantiene el medio de cultivo en constante mezcla. Los reactores se cubrieron con papel de aluminio para evitar la entrada de luz.

2.3.4 Variables de seguimiento de los bioreactores

Se tomaron alícuotas para medir densidad óptica a 600 nm (Hofer SP-2001), pH (Hanna Instruments HI-98160), nitrógeno total del efluente usando el kit comercial Hanna Instruments HI93767A-50 y concentración de AGVs. Los AGVs se midieron mediante cromatografía de gases (Perkin Elmer Clarus 590), con una columna elite FFAP 30m x 0.25 mm ID x 0.25 μm DF y un detector de ionización de flama. Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre a 15 psi con un split ratio de 120 mL/min. Las temperaturas del horno, el inyector y el detector se mantuvieron en 140, 250, y 250 °C, respectivamente. Las muestras para el análisis de AGVs se acidificaron con HCl al 37% (Honeywell Fluka, Austria), se filtraron con PTFE tamaño de poro $0.45 \mu m$, y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Se utilizó una mezcla estándar de AGVs 10 mM (Sigma-Aldrich, USA) para la curva de calibración, que incluye los ácidos: acético, propiónico, iso butírico, butírico, iso valérico, valérico, 4 metil valérico, hexanóico, y heptanóico.

2.3.5 Extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático

A los 28 días de operación, 50 mL del efluente de los reactores alimentados con AGVs fueron centrifugados a 10000 g por 30 minutos (UNIVERSAL 320 - Hettich), se descartó el sobrenadante y el pellet fue usado como material de partida para la extracción de ADN. Se usó el kit NucleoSpin Soil (Macherey–Nagel GmbH, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante (solución de lisis SL1). Se midió la calidad y cantidad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría usando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Las regiones del gen V3-V4 16S rRNA (341F - 805R) fueron secuenciadas por Mr.DNA Lab (Molecular Research LP Co, TX, USA) utilizando una plataforma Illumina MiSeq. Los datos de secuenciación fueron analizados utilizando QIIME2 v 2023.9 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). La eliminación de ruido, la desreplicación de las secuencias y el filtrado de quimeras con el método de consenso se realizaron utilizando DADA2 (Callahan et al., 2016) dentro de QIIME2. La asignación taxonómica de las variantes de secuencia de amplicones (ASV) (97% de identidad de secuencia) se realizó utilizando el complemento “fit-classifier-naïve-Bayes”, frente a la base de datos de referencia SILVA 138. La visualización de abundancias e índices de diversidad se realizó usando el paquete Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) de R (R Core Team, 2022).

2.3.6 Análisis estadístico

Para las variables de seguimiento de los bioreactores se realizó un análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$), se probaron los supuestos de normalidad mediante prueba de Shapiro-Wilks y homogeneidad de varianzas mediante prueba de Bartlett. Se realizaron análisis de comparaciones de medias usando Tukey ($p < 0,05$). Todos los análisis fueron realizados usando el programa R (R Core Team, 2022). Se realizó una correlación de Pearson entre las variables fisicoquímicas de los reactores y las abundancias relativas a nivel de género.

2.4 Resultados

Los resultados muestran que al iniciar la fase de enriquecimiento (figura 2) se obtuvo un crecimiento significativamente menor (ANOVA-Tukey $p < 0,05$) usando AGVs como fuente de carbono con respecto de la glucosa. Al finalizar la alimentación 5 y 6 se obtiene un

crecimiento significativamente mayor (ANOVA-Tukey $p < 0,05$) usando AGVs (figura 2). La oxidación de los AGVs genera un aumento significativo del pH con respecto al pH inicial hasta valores cercanos a 8 en la sexta alimentación, mientras que la de la glucosa genera una disminución a valores por debajo de 4 (figura 2). La fase de selección mostró que usando AGVs se obtiene una concentración significativamente mayor de nitrógeno total para la dilución 10^{-6} con respecto del inóculo sin ningún proceso de enriquecimiento o selección (figura 3).

Para el caso de la glucosa, en la fase de selección se obtienen cantidades de nitrógeno total significativamente menores con respecto al inóculo inicial. Adicionalmente, se evidenció una reducción significativa de la concentración de ácido butírico y ácido propiónico para cada una de las diluciones (figura 3) con respecto a un control no inoculado.

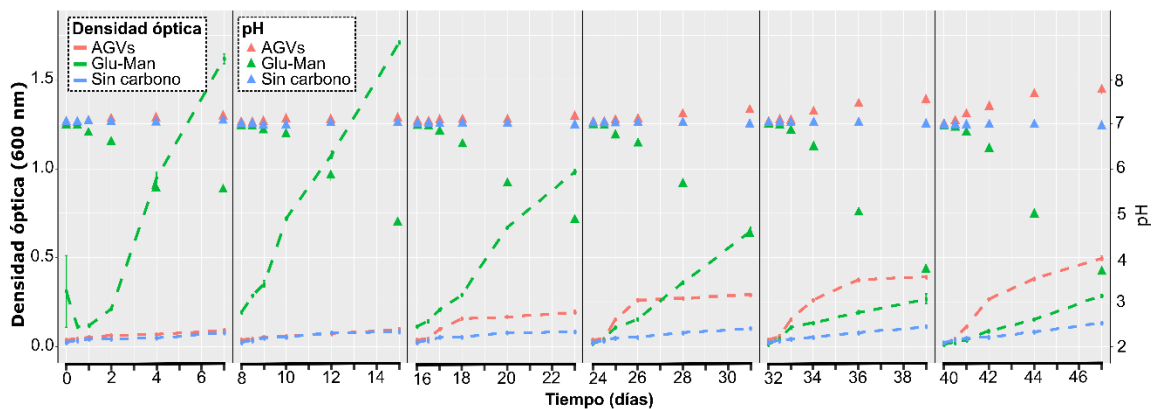


Figura 2. Densidad óptica (curvas discontinuas) y pH (triángulos) para cada una de las 6 alimentaciones sucesivas en la fase de enriquecimiento. AGVs: ácidos grasos volátiles, Glu-Man: mezcla de glucosa y manitol. $n=3$.

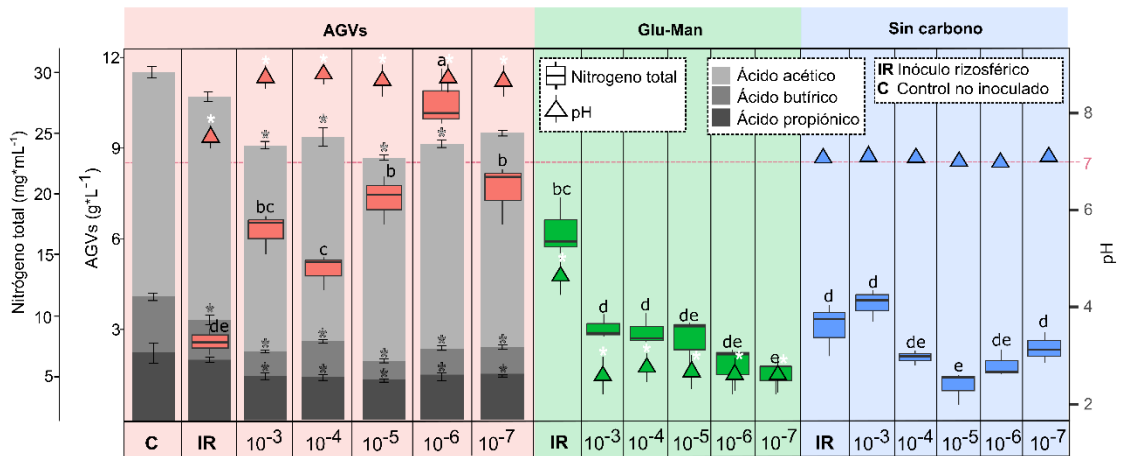


Figura 3. Variables fisicoquímicas en la fase de selección medidas a los 28 días de operación de los reactores. AGVs: ácidos grasos volátiles, Glu-Man: mezcla de glucosa y manitol. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas de nitrógeno total entre las diluciones (ANOVA -Tukey $p < 0,05$). * grises indican diferencias estadísticamente significativas en concentración de AGVs respecto al control no inoculado (ANOVA-Dunnet $p < 0,05$). * blancos indican diferencias estadísticamente significativas en pH respecto a pH 7 (ANOVA-Dunnet $p < 0,05$). $n = 3$.

Se realizó secuenciación del gen 16s rRNA para el inóculo rizosférico inicial y las comunidades obtenidas en las diluciones con AGVs como fuente de carbono. El proceso de enriquecimiento y posterior selección logró obtener comunidades microbianas con una composición diferente a la del inóculo inicial (Figura 4). Las comunidades obtenidas en las diluciones son similares entre sí predominando familias como *Nocardiaceae*, *Sphingobacteriaceae* y *Rhodobacteraceae*.

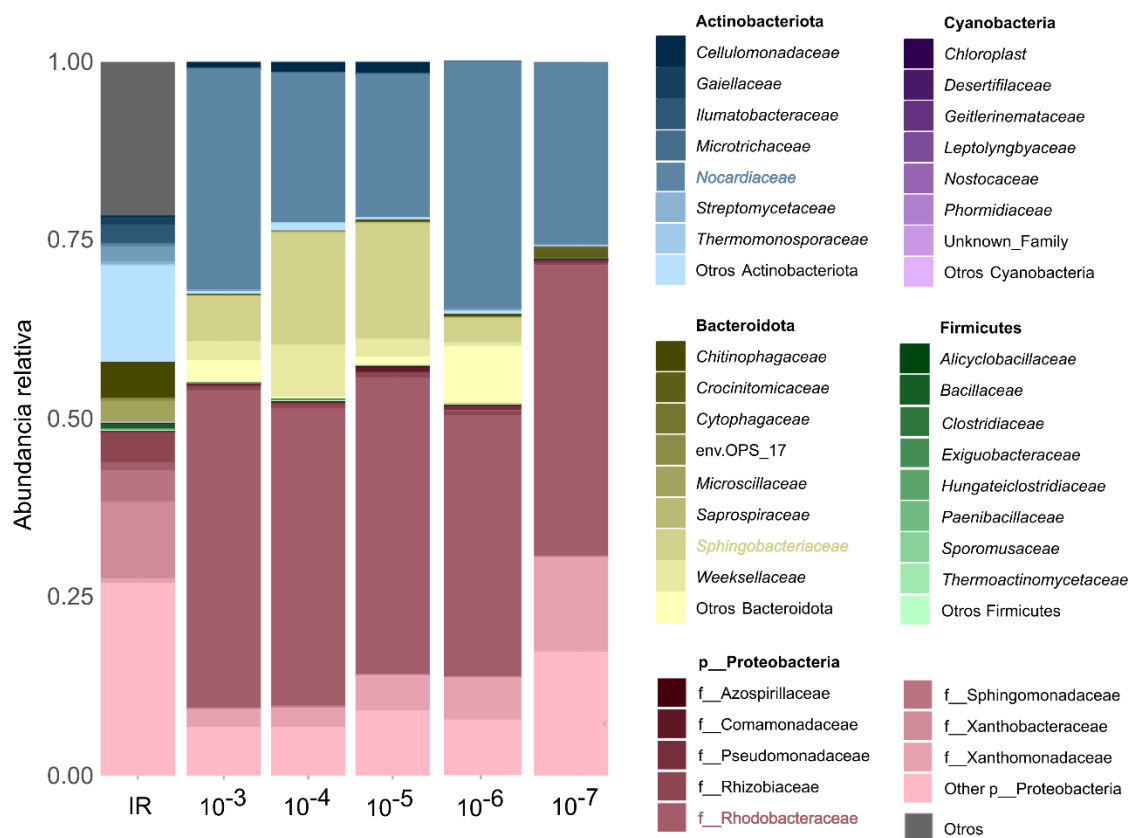


Figura 4. Abundancia relativa a nivel de Familia para el inóculo rizosférico (IR) y las diluciones obtenidas en la etapa de selección a los 28 días de operación de los reactores alimentados con AGVs. Los taxones resaltados corresponden a los más abundantes para cada phylum. n=3.

A nivel de género (Figura 5), en todas las diluciones se obtiene la presencia de *Gordonia sp.*, *Olivibacter sp.* y otros dos géneros que no fueron clasificados a nivel taxonómico (Unclassified_1 y Unclassified_2). La figura 6 muestra los valores de abundancia relativa para los 20 géneros más abundantes. Se observa que los géneros más abundantes obtenidos en la selección originalmente estaban es una abundancia por debajo del 2% en el inóculo rizosférico. Los índices de diversidad observed, chao1 y ACE muestran una reducción de hasta tres veces en las comunidades autoensambladas de cada dilución con respecto del inóculo rizosférico (Figura 7). Estos tres índices muestran también que a medida que aumenta la dilución la diversidad disminuye (Figura 7). El índice de Shannon muestra un valor por encima de 5 para el inóculo rizosférico mientras que para las comunidades obtenidas en las diluciones los valores están por debajo de 2,5. El índice de dominancia de Simpson muestra que en las comunidades de las diluciones los valores son

altos con respecto al inóculo rizosferico, evidenciando que hay pocos taxones con alta abundancia que dominan en la comunidad.

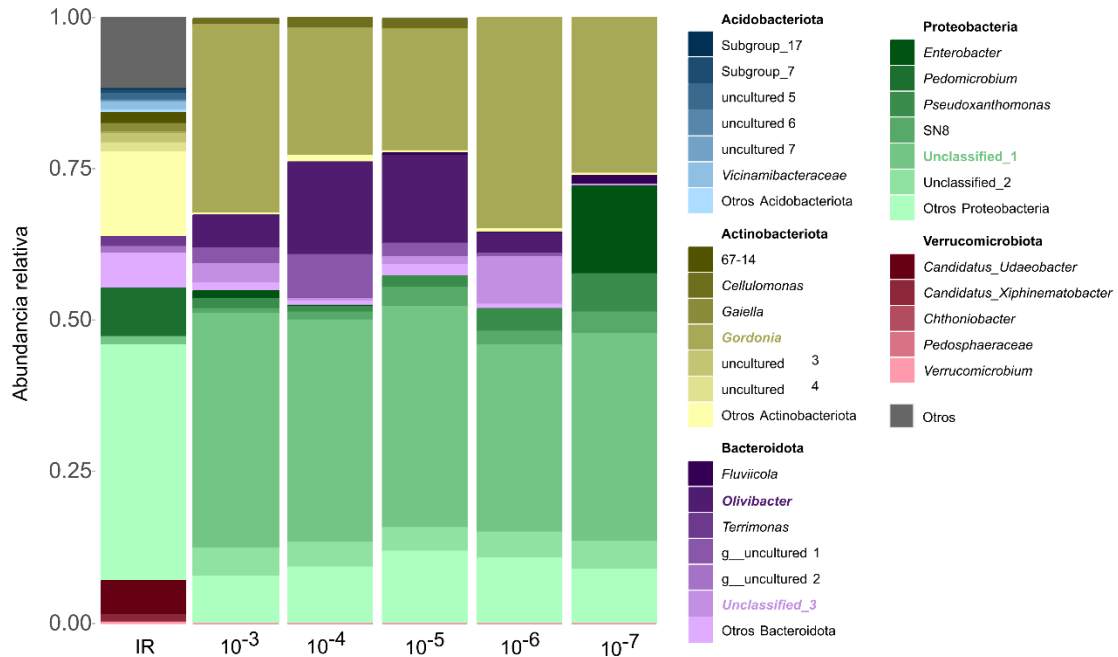


Figura 5. Abundancia relativa a nivel de genero para el inóculo rizosferico (IR) y las diluciones obtenidas en la etapa de selección a los 28 días de operación de los reactores alimentados con AGVs. Los taxones resaltados corresponden a los más abundantes para cada phylum. n=3.

Unclassified_1	38.7	36.7	36.6	31	34.3	1.2
Gordonia	31	21.1	20.1	34.7	25.7	0.4
<i>Olivibacter</i> -	5.4	15.2	14.6	3.5	0	0.1
uncultured-	2.6	7.3	2.2	0.5	0	15.7
Unclassified_2	4.7	4.2	3.9	4.2	4.6	0.1
<i>Enterobacter</i> -	1.3	0.2	0	0	14.6	0.1
Pseudoxanthomonas	1.6	1	1.8	3.6	6.4	0.2
Unclassified_3	3.2	0.3	1.3	8	0	0.1
SN8-	0.8	1.2	3.2	2.2	3.5	0.08
<i>Parapusillimonas</i> -	1.8	1.4	2.9	2.6	0.5	0
<i>Pedomicrobium</i> -	0	0	0	0	0	7.8
Gluconacetobacter	0.9	0.2	1.3	4.6	0	0
<i>Candidatus_Udaeobacter</i> -	0	0	0	0	0	5.7
Unclassified_4-	0.8	0.5	1	1	1.6	0
<i>Cellulomonas</i> -	1.1	1.5	1.8	0	0	0
<i>Steroidobacter</i> -	0	0	0	0	0	4.4
<i>Luteimonas</i> -	0	0.5	0	0.1	3.5	0
<i>Sphingomonas</i> -	0	0	0	0	0	4.1
Unclassified_5-	0.8	1.6	1.4	0	0	0
<i>Bradyrhizobium</i> -	0	0	0	0	0	3.2
Remaining taxa (164)-	5.4	7.1	8	4	5.2	57.3
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10⁻⁶	10 ⁻⁷	IR

Figura 6. Gráfico de calor con valores de abundancia relativa de los 20 géneros más abundantes en las muestras. Tonos rojos más intensos indican una alta abundancia y menos intensos una baja abundancia. IR: inóculo rizosferico. n=3.

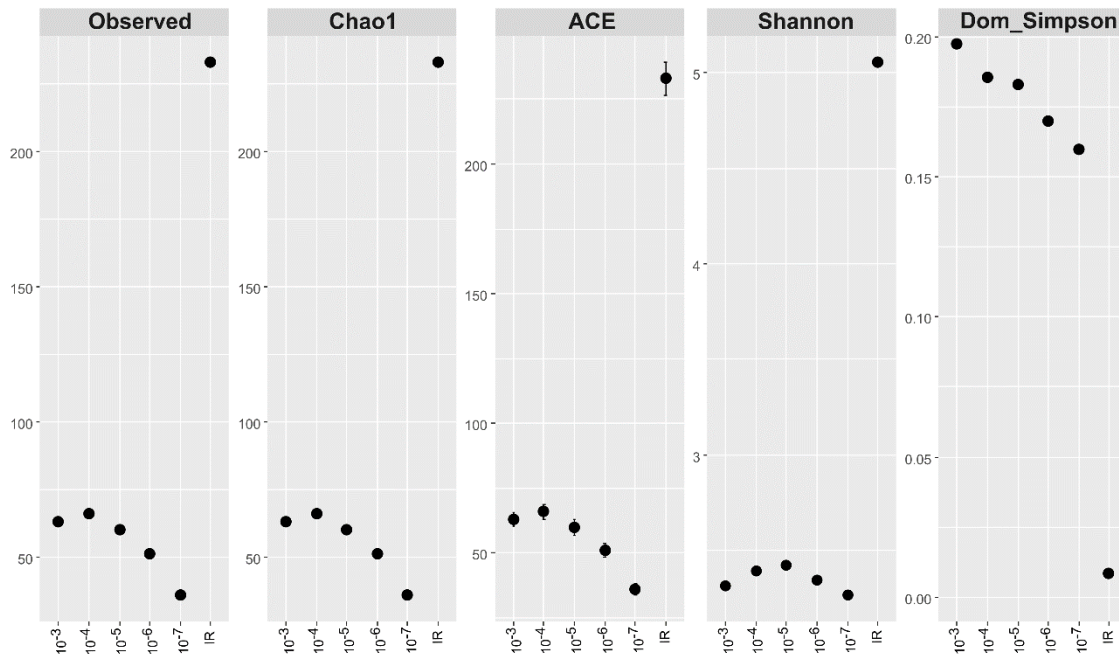


Figura 7. Valor promedio de los índices de alfa diversidad. IR: inóculo rizosferico.

2.5 Discusión

Este trabajo muestra que se puede usar ingeniería de microbiomas para obtener una comunidad autoensamblada fijadora de nitrógeno usando como factores de selección la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono. La comunidad obtenida en la dilución 10^{-6} es capaz de fijar una cantidad significativamente más alta de nitrógeno con respecto a la comunidad original y a las demás diluciones. Además, puede usar ácidos grasos de cadena volátiles como fuente de carbono para el proceso. Los resultados sugieren que un ligero aumento del pH está correlacionado con la fijación de nitrógeno (Figura 8) e incluso podría usarse el pH como indicador de la oxidación de los ácidos grasos en este bioproceso en particular.

En la fase de enriquecimiento se aprecia que los reactores alimentados con glucosa-manitol disminuyen paulatinamente su crecimiento en cada alimentación (figura 2). Además, al final de la fase de selección, usando glucosa-manitol como fuente de carbono

se obtienen cantidades de nitrógeno total incluso menores a las obtenidas sin usar ninguna fuente de carbono (figura 3).

Este comportamiento puede ser debido a los valores de pH que se alcanzan al final de cada alimentación, esta condición ácida puede hacer que se inhiba la fijación de nitrógeno debido a que la actividad de la nitrogenasa tiende a ser óptima en un rango de pH ligeramente alcalino a neutro, alrededor de pH 7-8 (Einsle *et al.*, 2020). Tanto valores de pH muy ácidos como muy alcalinos pueden inactivar la nitrogenasa (Einsle *et al.*, 2020). A pH extremadamente bajo o alto, la estructura tridimensional de la enzima puede desnaturalizarse, lo que resulta en una pérdida de actividad catalítica (Einsle *et al.*, 2020). Por otra parte, puede ser que se restrinja la diversidad de microorganismos que son capaces de soportar esas condiciones acidas. Finalmente, las condiciones ácidas pueden estar causando una desnitrificación acelerada, haciendo que el nitrógeno fijado se pierda rápidamente en forma de gas. Estos resultados remarcan la necesidad de usar sustancias amortiguadoras de pH y condiciones controladas en este tipo de sistemas cuando se usan azúcares simples como fuente de carbono.

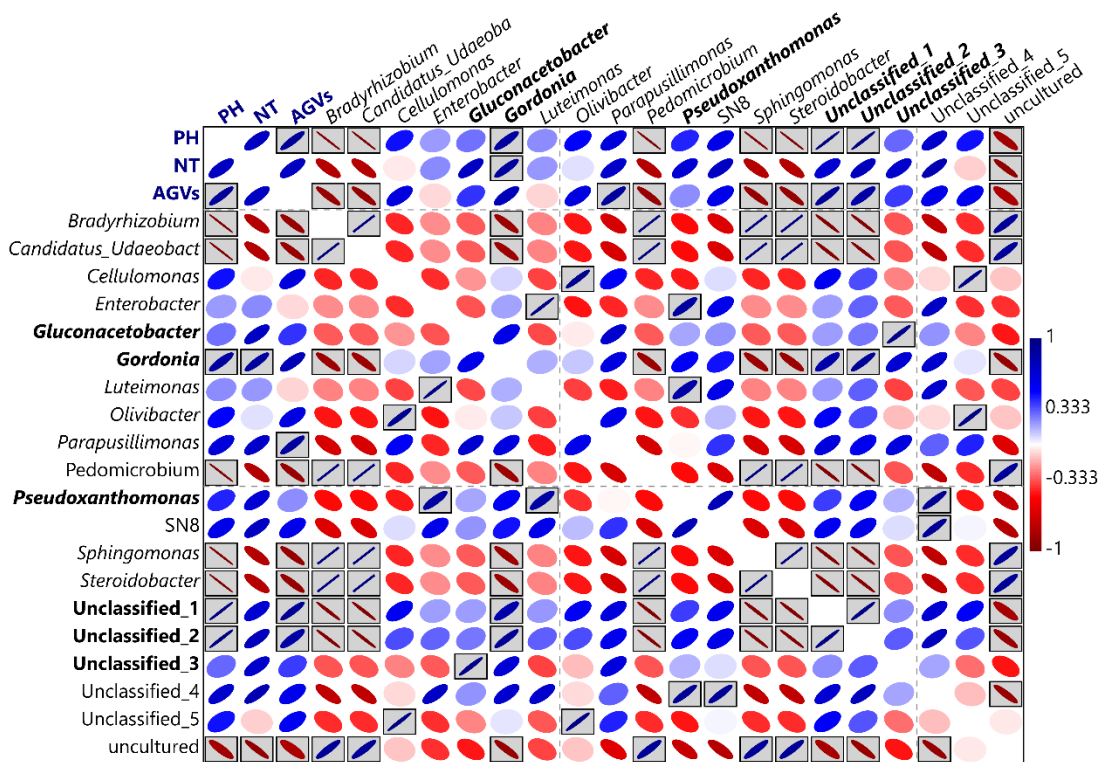


Figura 8. Matriz de correlación de Pearson de las abundancias a nivel de género y variables fisicoquímicas. Elipses azules indican correlaciones positivas y elipses rojas indican correlaciones negativas. Las elipses en recuadros grises indican correlaciones significativas ($p < 0,05$).

Pocas investigaciones han usado el aire como fuente de nitrógeno para cultivar microorganismos fijadores de nitrógeno en bioreactores. En el trabajo reciente de Gutiérrez y colaboradores (2022) lograron obtener una comunidad autoensamblada fijadora de nitrógeno donde los géneros más abundantes fueron *Sphingobium sp.*, *Pseudoxanthomonas sp.* y *Xanthobacter sp.*. En este trabajo, los géneros más abundantes en la comunidad autoensamblada que presentó mayor fijación de nitrógeno fueron *Gordonia sp.* (34,7%), *Unclassified_1* (31%) y *Unclassified_3* (8%), *Unclassified_2* (4,2%), *Pseudoxanthomonas sp.* (3,6%) y *Gluconoacetobacter sp.* (4,6%). Realizando un blast con las secuencias representativas obtenidas para los géneros no clasificados, lo más cercano que se obtiene es *Unclassified_1*: *Sinirhodobacter sp.* (93% de similaridad), *Unclassified_3*: *Sphingobacteria sp.* (89% de similaridad) y *Unclassified_2*: *Sinirhodobacter populi* (96% de similaridad). Sumando las abundancias, los seis taxones mencionados representan el 86.1% de la composición de la comunidad autoensamblada, por lo que se espera que la mayoría de la fijación de nitrógeno esté siendo realizada por ellos.

Como se esperaba, a medida que se aumentaron las diluciones hay una tendencia a disminuir la diversidad, debido a las condiciones de selección ecológica utilizadas (Figura 7). Sin embargo, se mantienen los mismos taxones como los más abundantes. Esto indica que en este caso el ensamblaje de la comunidad está siguiendo un patrón determinístico, es decir que se obtienen comunidades similares con unos factores de selección determinados. Estudios recientes hablan de que este tipo de ensamblaje de la comunidad obedece a algo llamado convergencia funcional que refleja una auto organización metabólica como una propiedad emergente de las comunidades microbianas (Chang et al., 2023; Estrela et al., 2022). Por otra parte, este trabajo evidencia que hay una diversidad de microorganismos fijadores de nitrógeno poco conocidos e incluso no clasificados aún, que podrían tener un alto potencial para desarrollar bioinoculantes.

La fase de selección usada en este trabajo, también conocida como dilución a extinción ha sido ampliamente usada para la obtención de cultivos puros. Solamente trabajos recientes

han mostrado su uso para inducir la formación de comunidades microbianas con funciones deseadas, como Diaz-García y colaboradores (2021) que lograron obtener una comunidad microbiana con capacidad para la degradación de compuestos lignocelulósicos, o Kang y colaboradores (2020) que obtuvieron un consorcio para degradar compuestos recalcitrantes. Sin embargo, esta es la primera vez que se usa esta metodología para obtener una comunidad diazótrofa. La importancia de este proceso radica en que en primer lugar induce una composición microbiana sencilla, es decir, pocos taxones que en comunidad son capaces de llevar a cabo la función deseada. Y, en segundo lugar, revela taxones poco conocidos que sería difícil obtenerlos en cultivos puros, porque posiblemente la única forma que puedan crecer es en asociación con otros microorganismos.

Pocos estudios han investigado el papel de *Gordonia sp.* como fijador de nitrógeno (Kayasth et al., 2014). Se ha explorado el potencial de especies de este género para degradar contaminantes o producción de biopolímeros (Sowani et al., 2018). Es un microorganismo que se ha encontrado como endófito en plantas y ha sido aislado del suelo también; por lo que tenerlo en una alta abundancia dentro de un bioreactor puede hacer potencialmente aplicable como inoculante. Los resultados muestran una correlación significativa entre la abundancia de *Gordonia sp.* y nitrógeno total (figura 8) evidenciando su papel como fijador de nitrógeno.

Sinirhodobacter es otro género que no se menciona frecuentemente dentro de los fijadores de nitrógeno, Keerthana-Ponni, (2021) caracterizó una cepa de *Sinirhodobacter sp* demostrando su capacidad de fijación de nitrógeno. Esta cepa antes mencionada y otras dos cepas (Xi et al., 2017; Young et al., 2020) han sido aisladas de efluentes de digestores anaerobios. Los resultados muestran que este género presenta una correlación significativa en cuanto al consumo de AGVs, confirmando su capacidad para usar AGVs como fuente de carbono. Posiblemente *Sinirhodobacter* consume los AGVs y de alguna forma le pasa la energía a *Gordonia sp.* que es el que fija nitrógeno. Estos dos géneros presentan una correlación entre sí, indicando probablemente una codependencia para poder sobrevivir dentro del bioreactor. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales que permitan confirmar o rechazar esta hipótesis. Por una parte se sugiere poder aislar en cultivo puro estos dos géneros con el fin de estudiar su metabolismo del C y del N. Se podría también usar metagenómica shotgun o metatranscriptómica para elucidar el papel funcional de cada microorganismo.

Es bien sabido que el complejo enzimático de la nitrogenasa es inhibido irreversiblemente por el oxígeno (Einsle & Rees, 2020). Se han descrito varios mecanismos por los cuales los microorganismos pueden proteger el complejo enzimático de la nitrogenasa como la microaerofilia, aumento en las tasas de respiración, producción de células especializadas, polisacáridos extracelulares o colonización de nódulos (Zuberer, 2021). Todos estos mecanismos se han elucidado a partir de cultivos puros y dejan la pregunta de ¿qué otros mecanismos pueden usar cuando se trata de una comunidad microbiana en un reactor aerobio con inyección constante? de aire como es el caso de este trabajo.

2.6 Conclusiones

Este estudio muestra la efectividad de la ingeniería de microbiomas para obtener una comunidad autoensamblada fijadora de nitrógeno. La mejora significativa en la capacidad de fijación de nitrógeno, especialmente en la dilución 10^{-6} , destaca la utilidad de esta estrategia. Los resultados revelan la presencia de taxones poco conocidos, como *Gordonia sp.* y *Sinirhodobacter sp.*, y otros no clasificados, desvelando su papel crucial en la fijación de nitrógeno y sugiriendo posibles interacciones sinérgicas entre ellos. La correlación positiva entre el aumento del pH y la fijación de nitrógeno, así como la capacidad de la comunidad para utilizar ácidos grasos de cadena volátiles, señalan aspectos clave del proceso. Además, la aplicación exitosa de las diluciones para obtener comunidades diazótrofes destaca su potencial innovador. Por último, las interrogantes sobre los mecanismos de protección del complejo enzimático de la nitrogenasa en comunidades aerobias abren la puerta a futuras investigaciones. En conjunto, estos hallazgos contribuyen significativamente al conocimiento y aplicaciones prácticas de la ingeniería de microbiomas en procesos biotecnológicos como la fijación de nitrógeno.

3. Capítulo 3: Valorización de ácidos grasos volátiles provenientes de estiércol de cerdo como fuente de carbono para alimentar comunidades microbianas fijadoras de nitrógeno

3.1 Resumen

Los residuos agroindustriales presentan un gran potencial de aprovechamiento mediante su transformación para la obtención de subproductos con valor agregado. El estiércol de cerdo puede aprovecharse mediante la digestión anaerobia para producir biogás, una fase sólida rica en materia orgánica y una fase líquida que contiene Ácidos Grasos Volátiles (AGVs). Este capítulo explora el uso de una mezcla de AGVs provenientes de efluentes de digestión anaerobia de estiércol de cerdo como fuente de carbono para cultivar una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno. Los resultados muestran que se obtiene un crecimiento y nitrógeno total significativamente mayor cuando se usa una mezcla de AGVs que usarlos por separado. Por otra parte, se logró obtener nitrógeno en el sobrenadante a una concentración $9,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Este trabajo muestra que es posible cultivar una comunidad microbiana fijadora de nitrógeno usando AGV de residuos agroindustriales y que además podría pensarse en dos tipos de formulaciones, la primera que sería usar directamente los microorganismos cultivados como inoculante y la segunda que sería usar el sobrenadante directamente como fertilizante o como fuente de nitrógeno para alimentar otros bioprocesos.

3.2 Introducción

Suplir la demanda de alimentos para el futuro no solo requiere insumos de producción, sino que también generan al año millones de toneladas de residuos agroindustriales. La industria animal genera al año 55 billones de toneladas de residuos (Giroto & Cossu,

2017). Uno de los sectores que más genera residuos es la industria porcícola debido a que es la tercera carne más producida en el mundo. Durante la cría de los cerdos se generan en promedio 2,35 kilogramos de estiércol por animal al día (FAO, 2022a), con una población mundial de 778 millones de cerdos en 2022, la producción anual de estiércol se estima en 1,8 billones de toneladas (USDA, 2024).

La digestión anaerobia (DA) es una de las técnicas de manejo de residuos más eficaces y respetuosas con el medio ambiente (Kumar & Samadder, 2020). No sólo trata la fracción orgánica de los residuos, sino que al mismo tiempo puede considerarse como un proceso intermedio para la generación de productos de valor agregado (Clavijo-Salinas et al., 2020; Lü et al., 2021). La digestión anaerobia como proceso de transformación primaria de un residuo es la que genera menores pérdidas del sistema, permite la separación primaria en tres fases y garantiza de alguna medida que la mayoría del sustrato se convierta en algún tipo de subproducto con valor agregado (Clavijo-Salinas et al., 2020). La fase líquida resultante normalmente no se aprovecha y se ha demostrado que puede contener altas concentraciones de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) (Atasoy et al., 2018). Los AGVs son el producto intermedio dominante del proceso de DA y son productos que se consideran más atractivos que el metano por su amplia variedad de aplicaciones (Singhania et al., 2013).

La producción y recuperación de AGVs a partir de residuos ha llamado la atención de la comunidad científica debido a su alto potencial como fuente de carbono renovable, su amplio rango de uso en las industrias farmacéutica, alimentaria y química y como materia prima valiosa para productos como el biogás, biodiesel, bioplásticos, biohidrógeno y bioelectricidad (Sekoai et al., 2021). Se estima que el potencial de producción anual de AGVs a partir de la transformación de residuos es de 9,15Mt de ácido acético, 5,39Mt de ácido butírico y 6,47Mt de ácido propiónico (Atasoy et al., 2018). En este contexto, vale la pena investigar otros usos para estas moléculas. La fijación de nitrógeno se ha propuesto como otra opción de valorización de los AGVs (Clavijo-Salinas et al., 2020). Sin embargo, a nivel experimental no existen trabajos que demuestren que AGVs obtenidos a partir de residuos orgánicos puedan ser útiles para cultivar microorganismos diazótrofos y producir biofertilizantes.

En este trabajo se hace una evaluación del uso de una mezcla de AGVs obtenida de estiércol de cerdo para cultivar una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Obtención de los AGVs

Se realizó una digestión anaerobia usando como sustrato estiércol de cerdo y lodo de un biodigestor que trata aguas residuales porcícolas como inóculo. Tanto sustrato como inóculo fueron obtenidos de la granja “El Porvenir” Palmira, Valle del Cauca, Colombia (3.5274246789298807, -76.21224613131322). El inóculo se conservó a temperatura ambiente y el estiércol se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. El proceso se llevó a cabo en un reactor con un volumen total de 10 L y un volumen efectivo de 6 L. Los sólidos totales (ST) se fijaron en 10%, la relación inóculo/sustrato en 0.2 y el pH inicial no se modificó. La temperatura se fijó en $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. El reactor fue operado en modo batch durante 10 días, luego se cambió a modo semi-continuo por un periodo de 32 días, con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 10 días y una tasa de carga orgánica de 12.16 g ST/L-día (Figura 1A). Las variables de seguimiento fueron la concentración de AGVs (como se describe en la sección 2.3.4) y el pH.

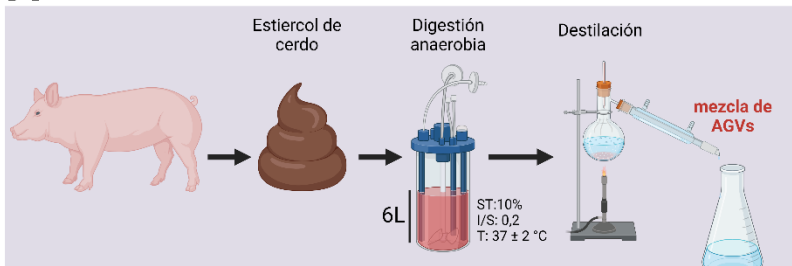
El efluente obtenido de la fermentación se destiló a presión atmosférica en un destilador de vidrio a escala de laboratorio, siguiendo el método de preparación de muestras para la determinación de AGV de acuerdo con Método Estándar 5560 C (APHA, 2017). La mezcla de AGVs obtenidos en el destilado fueron usados para la siguiente fase experimental.

3.3.2 Evaluación de los AGVs como fuente de carbono para cultivar una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno

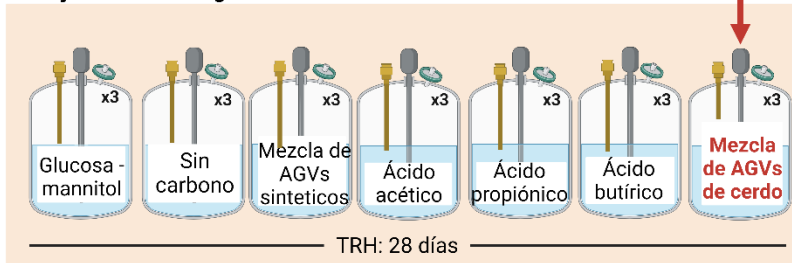
Se usó un diseño completamente al azar con siete tratamientos, cada tratamiento corresponde a una fuente de carbono diferente usando medio NFB (Rennie, 1981) como base (tabla 1).

Para cada tratamiento se usaron tres réplicas. Cada réplica consistió en el montaje como esta descrito en la figura 1C y en la sección 2.3.3. Los reactores fueron inoculados con 2,5 mL de la comunidad autoensamblada fijadora de nitrógeno (capítulo 2) obtenida para cada fuente de carbono evaluada. Los reactores fueron operados en semibatch durante 28 días. Se usaron AGVs sintéticos (Sigma-Aldrich) para los tratamientos Acético, Propiónico, Butírico y mezcla de AGVs sintéticos. La concentración de AGVs totales para estos tratamientos fue ajustada a 830 mg*mL, para acercarse a la concentración total de AGVs que se obtuvo en el producto destilado proveniente de estiércol de cerdo. Cada semana se tomaron muestras para seguimiento de las variables descritas en 3.3.3. Se agregó agua destilada estéril para mantener un volumen efectivo de 250 mL durante el tiempo de operación. Se tomaron alícuotas cada semana para medir densidad óptica a 600 nm (Hoefer SP-2001), pH (Hanna Instruments HI-98160) y nitrógeno total. El nitrógeno total se midió tanto en la biomasa microbiana como en el sobrenadante. Para ello, 5 mL del efluente del reactor fueron centrifugados a 5500 rpm por 15 minutos, el pellet fue separado del sobrenadante y fue resuspendido en 5 ml de agua destilada. Posteriormente se tomaron 2 mL tanto del pellet resuspendido como del sobrenadante para hacer la medición de nitrógeno total usando el kit Hanna Instruments HI93767A-50. Se midió la concentración de AGVs a los 28 días de operación de los reactores (como se describe en la sección 2.3.4).

A Digestión anaerobia para la obtención de AGVs



B Evaluación de AGVs provenientes de estiércol de cerdo para cultivar fijadores de nitrógeno



C Montaje usado para los reactores aerobios fijadores de nitrógeno

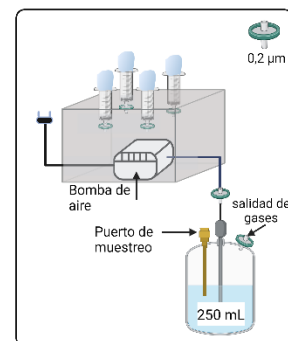


Figura 1. Esquema experimental usado para la evaluación de una mezcla de AGVs proveniente de estiércol de cerdo como fuente de carbono para alimentar una comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno. A: obtención de los AGVs a partir del estiércol de cerdo, B: comparación de los AGVs de cerdo con otras fuentes de carbono, C: sistema de bioreactores usado.

Tabla 1. Tratamientos evaluados y concentraciones de las fuentes de carbono

Fuente de carbono	Mezcla AGVs sintéticos *	Mezcla de AGVs de cerdo *	Ácido acético *	Ácido propiónico *	Ácido butírico *	Sin carbono *	Glucosa - manitol *
Ácido acético (mg*L ⁻¹)	600	463,10	830	0	0	0	0
Ácido propiónico (mg*L ⁻¹)	100	108,33	0	830	0	0	0
Ácido butírico (mg*L ⁻¹)	130	123,4	0	0	830	0	0
Ácido isobutírico (mg*L ⁻¹)	0	40.63	0	0	0	0	0
Ácido isovalérico (mg*L ⁻¹)	0	64,16	0	0	0	0	0
Ácido valérico (mg*L ⁻¹)	0	29.29	0	0	0	0	0
Glucosa (g*L ⁻¹)	0	0	0	0	0	0	8
Manitol (g*L ⁻¹)	0	0	0	0	0	0	8

*Adicional a las fuentes de carbono, se añadieron otros nutrientes en las siguientes cantidades para 1 L de medio de cultivo: 0.5g K₂HPO₄, 0.1g NaCl, 0.2g MgSO₄, 0.2g KOH, 0.02g CaCl₂, 2 mL de solución de micronutrientes y 4 mL de solución Fe-EDTA. Solución de micronutrientes para 200 mL: 0.02g Na₂MoO₄ 2H₂O, 0.235g MnSO₄, 0.280 g H₃BO₃,

0.008 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0.0024 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Solución de Fe-EDTA para 100 mL: 0.8258 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.556 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El pH del medio fue ajustado a 7.

3.3.3 Extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático

Este análisis se realizó solamente para los tratamientos mezcla AGVs de cerdo (MC) y mezcla de AGVs sintética (MS). 50 mL del efluente de los reactores fueron centrifugados a 10000 g por 30 minutos (UNIVERSAL 320 - Hettich), se descartó el sobrenadante y el pellet fue usado como material de partida para la extracción de ADN. Se usó el kit NucleoSpin Soil (Macherey–Nagel GmbH, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se midió la calidad y cantidad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría usando Nanodrop 200 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU).

Las regiones del gen V3-V4 16S rRNA (341F - 805R) fueron secuenciadas por Mr.DNA Lab (Molecular Research LP Co, TX, USA) utilizando una plataforma Illumina MiSeq. Los datos de secuenciación fueron analizados utilizando QIIME2 v 2023.9 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). La eliminación de ruido, la desreplicación de las secuencias y el filtrado de quimeras con el método de consenso se realizaron utilizando DADA2 (Callahan et al., 2016), dentro de QIIME2. La asignación taxonómica de las variantes de secuencia de amplicones (ASV) (97% de identidad de secuencia) se realizó utilizando el complemento “fit-classifier-naïve-Bayes”, frente a la base de datos de referencia SILVA 138. La visualización de abundancias e índices de diversidad se realizó usando el paquete Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) de R (R Core Team, 2022).

3.3.4 Análisis estadístico

Para las variables de seguimiento de los bioreactores se realizó un análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$), se probaron los supuestos de normalidad mediante prueba de Shapiro-Wilks y homogeneidad de varianzas mediante prueba de Bartlett. Se realizaron análisis de comparaciones de medias usando Tukey ($p < 0,05$). Todos los análisis fueron realizados usando el programa R (R Core Team, 2022).

3.4 Resultados

Se obtuvo un crecimiento significativamente mayor cuando se usó una mezcla de ácidos grasos ya sea sintética o proveniente del estiércol de cerdo (Figura 2A). Usar solamente ácido butírico también genera un crecimiento significativamente mayor al que se obtiene usando solamente ácido acético o ácido propiónico (Figura 2A). Nuevamente los resultados muestran un aumento significativo del pH cuando se usan ácidos grasos ya sean separados o en mezcla y una disminución significativa cuando se usa glucosa-manitol (Figura 3B).

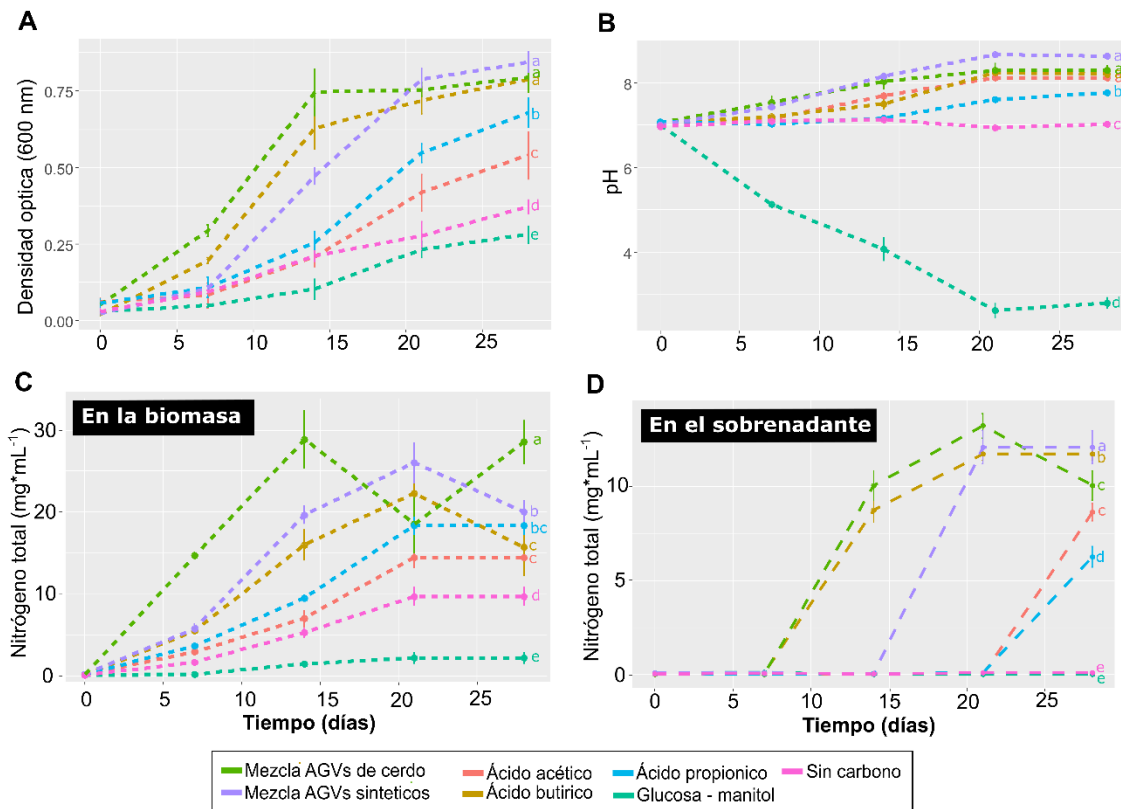


Figura 2. Variables fisicoquímicas medidas durante 28 días. A: densidad óptica, B: pH, C: Nitrógeno total en la biomasa, D: Nitrógeno total en el sobrenadante. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas en el día 28 (ANOVA-Tukey $p < 0,05$).

Se midió nitrógeno total en biomasa y sobrenadante. Se obtuvo un pico de nitrógeno total en la biomasa para el tratamiento alimentado con una mezcla de AGVs de cerdo (figura 2C). Este pico coincide con el inicio de la fase estacionaria a los 14 días de operación.

Igualmente, en el sobrenadante se obtiene nitrógeno a partir de los 14 días para los tratamientos con ácido butírico y mezcla de AGVs de estiércol de cerdo y a los 21 días para la mezcla de AGVs sintéticos (figura 2D); también coincide con el inicio de la fase estacionaria.

Todos los tratamientos partieron de la misma concentración total de AGVs; sin embargo, se observa un consumo diferencial. Se aprecia un consumo por encima del 90% para la mezcla de AGVs de cerdo y para ácido butírico (Figura 3). El menor consumo corresponde al ácido acético, representado en un 35,28% de la cantidad inicial.

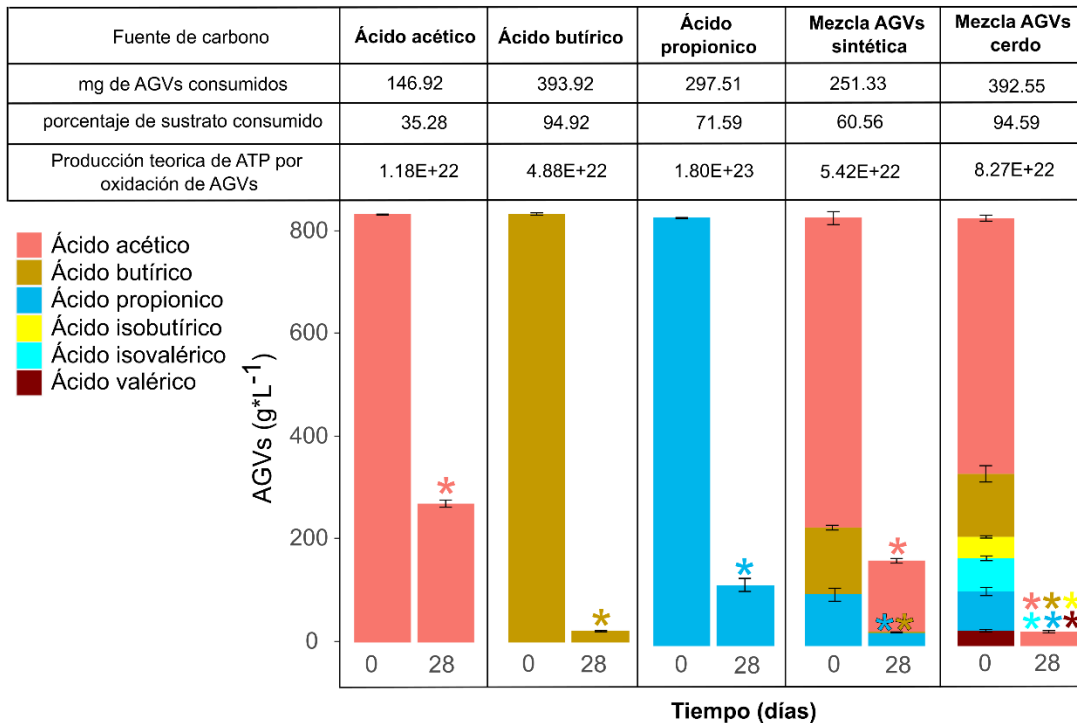


Figura 3. Concentración de AGVs en el día 0 y el día 28. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas en el día 28 (ANOVA-Tukey $p < 0,05$).

Los resultados de secuenciación muestran una composición microbiana diferente en cada caso (Figura 4). Para la mezcla de AGVs sintéticos predominan como más abundantes los géneros *Gordonia sp.* (34,7%), *Unclassified_1* (31%) y *Unclassified_3* (8%). Para la mezcla de AGVs de cerdo predominan *Unclassified_1* (24,4%), *Aureimonas* (24,7) y *Taibaiella* (21,2) (Figura 6).

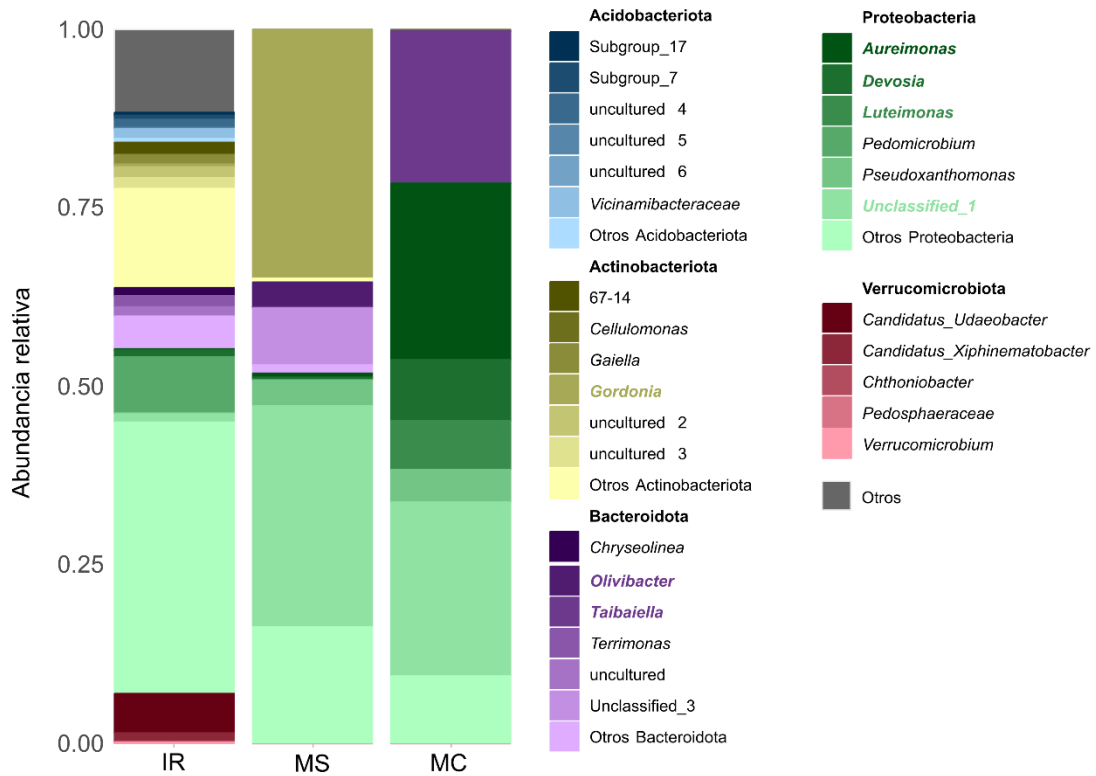


Figura 4. Abundancia relativa a nivel de Genero para el inóculo rizosferico (IR), la mezcla de AGVs sintética (MS) y la mezcla de AGVs de cerdo (MC) a los 28 días de operación de los reactores. Los taxones resaltados corresponden a los géneros más abundantes para cada phylum.

Los índices de alfa diversidad (Figura 5) muestran una menor diversidad en la comunidad que se obtiene en el tratamiento en el que se usó AGVs de cerdo como fuente de carbono y una alta dominancia de taxones específicos. La figura 6 muestra un mapa de calor con los 20 géneros más abundantes. Tanto para MS como para MC, se usó como inoculo la misma comunidad autoensamblada obtenida en el capítulo 2. Se aprecia que al cultivar la comunidad autoensamblada con AGVs de cerdo, algunos taxones desaparecen como *Gordonia sp.*, *Unclassified_3* o *Gluconoacetobacter sp.*, mientras que hay otros que incrementan su abundancia como *Aureimonas* o *Taibaiella* que pasan de menos de 2% a 24,7% y 21,2% respectivamente.

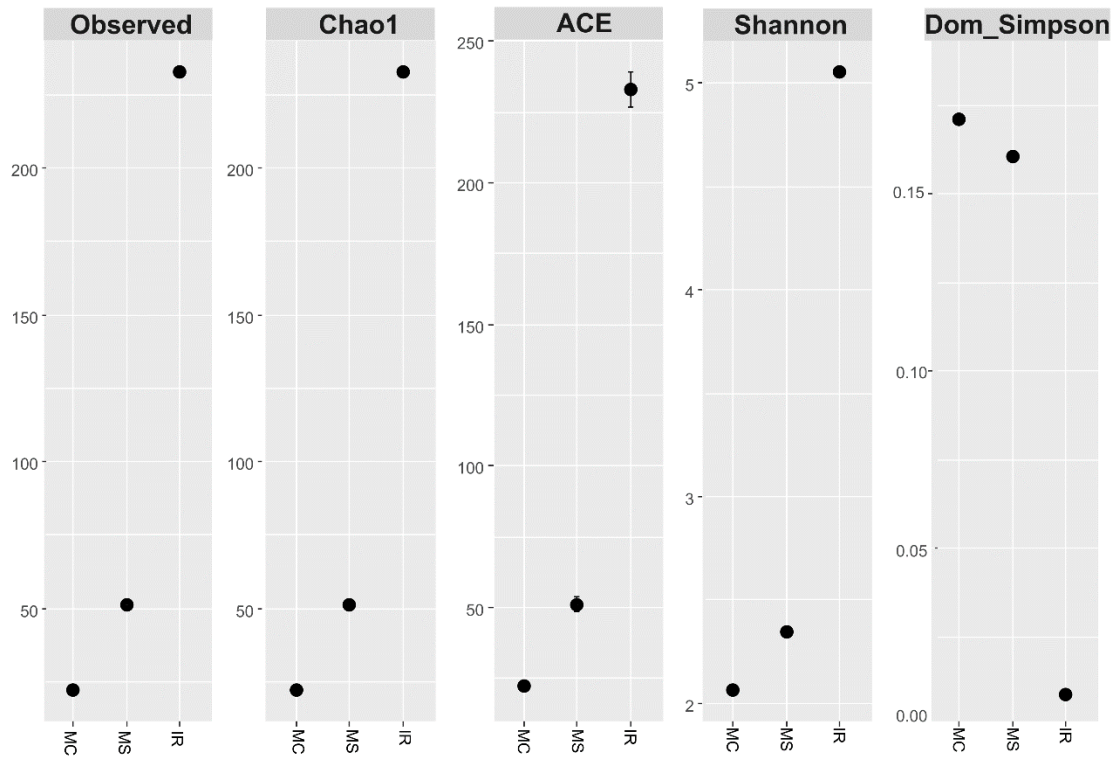


Figura 5. Promedio de los índices de alfa diversidad. IR: inóculo rizosferico. MC: mezcla de AGVs de cerdo, MS: mezcla de AGVs sintética.

Unclassified_1-	24.4	31	1.2
<i>Aureimonas</i> -	24.7	0.5	0.2
<i>Taibaiella</i> -	21.2	0.1	0
<i>Gordonia</i> -	0	34.7	0.4
<i>Devosia</i> -	8.5	0.4	0.8
uncultured-	0	0.5	15.7
<i>Pseudoxanthomonas</i> -	4.6	3.6	0.2
<i>Luteimonas</i> -	6.9	0.1	0
<i>Pseudomonas</i> -	5	0.6	0
Unclassified_2-	2.8	4.2	0.1
Unclassified_3-	0	8	0
<i>Pedomicrobium</i> -	0	0	7.8
<i>Candidatus_Udaeobacter</i> -	0	0	5.7
<i>Gluconacetobacter</i> -	0	4.6	0
<i>Steroidobacter</i> -	0	0	4.4
<i>Sphingomonas</i> -	0	0	4.1
<i>Parapusillimonas</i> -	0.8	2.6	0
<i>Olivibacter</i> -	0.1	3.5	0
<i>Bradyrhizobium</i> -	0	0	3.2
KD4-96-	0	0	2.4
Remaining taxa (135)	1.1	5.7	53.8
	MC	MS	IR

Figura 6. Gráfico de calor con valores de abundancia relativa de los 20 géneros más abundantes en las muestras. Tonos rojos más intensos indican una alta abundancia y menos intensos una baja abundancia. IR: inóculo rizosférico. MC: mezcla de AGVs de cerdo, MS: mezcla de AGVs sintética.

3.5 Discusión

Este es el primer trabajo que muestra la fijación biológica de nitrógeno como opción de valorización de AGVs que se puedan obtener a partir de residuos agroindustriales. Los resultados muestran que usar una mezcla de AGVs funciona mejor en términos de crecimiento microbiano y nitrógeno fijado a usar AGVs separados. Es importante mencionar que aparentemente los microorganismos prefieren AGVs de cadena más larga, como es el caso del ácido butírico, ya que se observa un mayor consumo con respecto al acético o propiónico. En la mezcla de AGVs de cerdo se tiene además ácido valérico e isovalérico y son los que se consumen en su totalidad. Los microorganismos convierten los AGVs en acetil Co-A por la ruta de la B-Oxidación y posteriormente se produce ATP por el ciclo de Krebs (Clark & Cronan, 2005). El tener una cadena carbonada más larga (ácido valérico e isovalérico) hace que teóricamente se pueda producir una mayor cantidad de ATP que es el recurso más limitante para la fijación de nitrógeno (Zuberer, 2021).

Recientemente se han enfocado esfuerzos en obtener cada AGV por separado a partir de la mezcla de AGVs y evaluar formas de valorización como fuente de carbono para diferentes bioprocesos. Sin embargo, obtener cada AGV por separado siendo poco eficiente y costoso (Atasoy et al., 2018). En este sentido la evaluación de formas de valorización que usen la mezcla de AGVs puede ser más aplicable. Nuestros resultados muestran que la mezcla funciona mejor en términos de fijación de nitrógeno que usar ácido acético o ácido propiónico por separado. Es importante mencionar que es posible que, durante el proceso de destilación para la obtención de los AGVs, existan otros compuestos que no se determinaron y que estén favoreciendo el crecimiento de la comunidad autoensamblada.

Un aspecto importante de los resultados obtenidos es que se logra obtener nitrógeno en el sobrenadante, es decir, que las células bacterianas están liberando el nitrógeno. Normalmente la liberación del nitrógeno en microorganismos diazótrofos está bajo un riguroso control genético (Bueno Batista & Dixon, 2019), puesto que la fijación de nitrógeno, al ser un proceso costoso en términos energéticos, no resulta viable liberar el nitrógeno fijado. En cultivos puros de *Azotobacter vinelandii* se ha logrado una concentración de nitrógeno extracelular de 20 mM de amonio (Ambrosio et al., 2017). En este caso, al llegar a fase estacionaria, se observa liberación de nitrógeno en el sobrenadante de 15 mg*mL⁻¹ de nitrógeno total.

Como sucede con las asociaciones simbióticas entre rizobios y leguminosas, algunos estudios demuestran que microorganismos diazótrofos de vida libre pueden liberar nitrógeno cuando están en asociación con otros microorganismos o plantas (Ambrosio et al., 2017; Ortiz-Marquez et al., 2012, 2014). Por otra parte, esta liberación de nitrógeno puede estar relacionada también con la disponibilidad de fuentes de carbono en el medio de cultivo (Batista et al., 2021). En cualquier caso, poder entender mejor estos mecanismos dentro del bioreactor podría significar la producción de nitrógeno reactivo que puede ser usado directamente como biofertilizante o como fuente nutricional para otros bioprocesos. En este sentido, se han propuesto las biofábricas fijadoras de nitrógeno como alternativa a Haber Bosch (Ortiz-Marquez et al., 2014). Investigaciones recientes han estudiado comunidades microbianas fijadoras de nitrógeno en sistemas de tratamientos de residuos de papelera y sugieren que los efluentes tratados mantienen una capacidad de fijación de

nitrógeno que los hace potenciales para ser usados como biofertilizantes (Ospina-Betancourth et al., 2020, 2021).

Desde el punto de vista de la operación de los reactores, se podría pensar en optimizar las condiciones de cultivo para poder maximizar la fijación de nitrógeno. Se pueden evaluar diferentes concentraciones de AGVs, tiempos de retención, temperatura, concentración de oxígeno, entre otras. Un aspecto importante de este trabajo es que se ajusta muy bien dentro de un contexto de economía circular y biorrefinerías, en donde se agrega valor a los residuos para obtener bioproducto mediante la fijación de nitrógeno, y que a su vez se pueden conectar otros bioprocesos para aprovechar el nitrógeno fijado.

3.6 Conclusiones

En conclusión, este estudio pionero destaca la fijación biológica de nitrógeno como una opción prometedora de valorización de ácidos grasos volátiles (AGVs) obtenidos a partir de residuos agroindustriales. Los resultados indican que la utilización de una mezcla de AGVs, es más eficiente que el uso de AGVs por separado. La preferencia de los microorganismos por los AGVs de cadena más larga se traduce en una mayor producción teórica de ATP, un recurso crítico para la fijación de nitrógeno.

La liberación de nitrógeno en el sobrenadante abre nuevas perspectivas para la producción de nitrógeno reactivo que podría ser utilizado como fuente nutricional directamente en las plantas o en otros bioprocesos. Este estudio no solo contribuye al conocimiento sobre la valorización de AGVs y la fijación de nitrógeno, sino también plantea la posibilidad de implementar biofábricas fijadoras de nitrógeno como una alternativa viable a los métodos convencionales, ofreciendo nuevas perspectivas en la producción sostenible de biofertilizantes y otros productos biotecnológicos.

4. Capítulo 4: Potencial biofertilizante de comunidades microbianas autoensambladas fijadoras de nitrógeno en plantas de tomate

4.1 Resumen

El tomate, una hortaliza ampliamente consumida y producida globalmente, desempeña un papel clave en la nutrición humana. Para producir tomate es indispensable aportar nutrientes como el nitrógeno, sin embargo, hay muchos problemas económicos y sociales asociados a los fertilizantes nitrogenados a nivel de producción y aplicación. En respuesta, los biofertilizantes se presentan como una alternativa para aportar nutrientes reduciendo los impactos ambientales. Este estudio se enfoca en evaluar el potencial como biofertilizante de comunidades microbianas diazótroficas, cultivadas con ácidos grasos volátiles obtenidos a partir de estiércol de cerdo, sobre el crecimiento de plantas de tomate tanto en sistemas hidropónicos y en suelo. Los resultados muestran que tanto en hidroponía como en suelo, la inoculación de las plantas de tomate con la comunidad autoensamblada ya sea la biomasa centrifugada o directamente el efluente del cultivo microbiano, permite aumentar el crecimiento y producción en más de un 30% con respecto a un control negativo y se alcanzan valores iguales a los obtenidos con una fertilización química convencional. La comunidad autoensamblada cultivada en los reactores logró un crecimiento y producción significativamente mayor a usar un producto comercial con cepas puras como ingrediente activo.

4.2 Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) ha sido un componente fundamental en la dieta global, desempeñando un papel esencial en la nutrición humana debido a su riqueza en nutrientes y versatilidad culinaria (Burton-Freeman & Reimers, 2011). Es una de las hortalizas más

producidas y consumidas en el mundo (Costa & Heuvelink, 2018). Para el año 2021, se produjeron 190 millones de toneladas a nivel mundial (FAOSTAT, 2023a). El tomate se produce en el 86% de los países del mundo, por lo que representa una gran importancia en términos de soberanía alimentaria (Branthôme, 2023). En Colombia se producen anualmente 851.000 toneladas de tomate (FAOSTAT, 2023a).

El tomate se produce tanto en suelo como en sistemas hidropónicos, cualquier sea el caso, es necesario aportar nitrógeno para suplir la demanda de aproximadamente 12 g por planta por ciclo de cultivo (Estrada Salazar et al., 2004). En este contexto, los fertilizantes nitrogenados han sido esenciales para mantener y aumentar la producción. Sin embargo, su uso indiscriminado ha llevado a problemas medioambientales significativos, como la contaminación del agua y la emisión de gases de efecto invernadero (Ren et al., 2022). Además de los problemas ambientales, los costos de este tipo de fertilizantes están en aumento a nivel mundial, y se presume que seguirán aumentando (FAO, 2022b).

En este sentido, los biofertilizantes surgen como una alternativa prometedora para mitigar los impactos ambientales asociados a la producción agrícola (Aloo et al., 2022). Estos compuestos, derivados de organismos vivos, ofrecen una opción más ecológica y respetuosa con el entorno, al tiempo que promueven la salud del suelo y aumentan la eficiencia de nutrientes (Aloo et al., 2022). Del mercado global de biofertilizantes, se estima que el 75% son biofertilizantes fijadores de nitrógeno (Bonilla Buitrago et al., 2021), la mayoría de ellos están destinados para plantas leguminosas debido a que están desarrollados a partir de *Rhizobium*, el resto de ellos están desarrollados a partir de cepas puras de *Azotobacter* y *Azospirillum* principalmente (Aloo et al., 2021).

Para que un biofertilizante fijador de nitrógeno sea exitoso en plantas no leguminosas, debe ser capaz de formar una asociación mutualista en la rizosfera (Zuberer, 2021), pudiendo ser capaz de usar los exudados radiculares como fuente de carbono para realizar la fijación de nitrógeno (Zuberer, 2021). Es bien sabido que la variedad de exudados radiculares es muy dinámica y cambia dependiendo de las necesidades de la planta (Vives-Peris et al., 2020). Se ha estudiado la composición de los exudados radiculares cuando la planta está sometida a diferentes tipos de estrés biótico o abiótico (Nakayasu et al., 2023), Sin embargo, poco se conoce de las moléculas que se secretan bajo una deficiencia de nitrógeno, solamente existen algunos estudios en maíz y *Arabidopsis* que han mostrado

una correlación significativa entre la exudación de algunas moléculas como flavonas y ácidos orgánicos con la fijación de nitrógeno (Yu et al., 2021; Zhao et al., 2021). Un bioinoculante debería tener la capacidad de responder ante estos exudados; usar un inoculante complejo con una mayor diversidad taxonómica o una mayor diversidad funcional podría hacerlo más versátil y podría permitirle metabolizar fuentes de carbono más variadas, lo que representa una ventaja competitiva en la rizosfera con respecto a una formulación con solo una especie (Gutierrez et al., 2020).

La agricultura ha ido migrando hacia nuevas formas de producción. Los sistemas hidropónicos emergen como una técnica de cultivo eficiente que minimiza el uso de suelo y agua (Monisha et al., 2023). Sin embargo, mantiene la necesidad de usar nutrientes para asegurar la producción (Meselmani, 2022). Normalmente se usan soluciones nutritivas y se aporta nitrógeno usando sales de amonio o nitrato que provienen del proceso de Haber Bosch (Meselmani, 2022). En este sentido, evaluar el uso de biofertilizantes en sistemas hidropónicos se hace necesario para una producción sostenible (Karapetyan, 2023).

En este trabajo se hace una evaluación del potencial biofertilizante de comunidades microbianas diazótrofes autoensambladas, cultivadas con una mezcla de ácidos grasos volátiles (AGVs), obtenidos de estiércol de cerdo en plantas de tomate tanto en hidroponía como en suelo.

4.3 Materiales y métodos

Se realizaron dos montajes experimentales con plantas de tomate, uno en hidroponía y otro en suelo bajo invernadero. El objetivo de los dos experimentos fue evaluar el potencial biofertilizante de la comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno alimentada con una mezcla de AGVs de cerdo que se describen en el capítulo 3.

4.3.1 Montaje experimental en hidroponía

Se usó un sistema hidropónico tipo “deep-water” culture o balsa flotante (Son et al., 2020) (figura 1A) para evaluar el efecto del sobrenadante y de la biomasa obtenidas en el capítulo 3 sobre el crecimiento de plantas de tomate. Se usaron semillas de tomate de la variedad UNAPAL-Maravilla (Estrada Salazar et al., 2004). Las semillas fueron puestas a germinar

en cajas de petri en oscuridad durante 4 días a una temperatura de 25°C y posteriormente fueron transplantadas al sistema hidropónico. En cada tanque se usó un volumen de trabajo de 12 L, con agua de grifo. La oxigenación de la solución nutritiva se realizó usando una bomba de aire con flujo constante manteniendo un porcentaje de oxígeno disuelto del 2%. Las condiciones de la sala de crecimiento fueron temperatura promedio de 26 °C ± 3°C, 70% ± 4 de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h suministrado por luces LED (densidad de flujo de fotones fotosintéticos 600 μmol m⁻² s⁻¹). Se usó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos como se describe en la tabla 1. Cada tanque corresponde a un tratamiento diferente y se usaron 6 plantas por tanque (figura 1a).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos y forma de aplicación

Tratamiento	Características	Aplicación
BIOM*	El efluente del reactor es centrifugado a 5082 g por 30 minutos, el pellet es resuspendido en solución salina 0,85% y ajustado a una densidad óptica de 0,3 OD 600 nm (Hofer Vision SP-2001).	Se aplicó semanalmente 10 mL del producto dentro del tanque, durante tres semanas.
SOBRE*	El efluente del reactor es centrifugado a 5082 g por 30 minutos, el sobrenadante es colectado, se determinó nitrógeno total (Hanna Instruments HI93767A-50) (9,8 mg*mL ⁻¹) y fue esterilizado.	Se aplicó 257 mL del sobrenadante esterilizado y se completó a 12 litros con agua del grifo para lograr una concentración final de 210 ppm de nitrógeno total en el tanque.
AZO*	Biofertilizante comercial Dimazos® a base de <i>Azotobacter chroococum</i> y <i>Azospirillum sp.</i>	Se aplicó semanalmente 10 mL del producto dentro del tanque, durante tres semanas siguiendo la dosis recomendada por el fabricante.
NITRO	Fertilización nitrogenada con solución de Hoagland	Se aplicó una sola vez, con las concentraciones finales al 100% (Kaur et al., 2016)
C-*	Solución de Hoagland modificada sin aporte de nitrógeno	Se aplicó una sola vez, con las concentraciones finales al 100%, sin aporte de nitrógeno (Gutiérrez et al., 2022)

*Los macro y micronutrientes fueron aportados con solución de Hoagland (100%) modificada sin aporte de nitrógeno como lo describe Gutierrez et al, 2022.

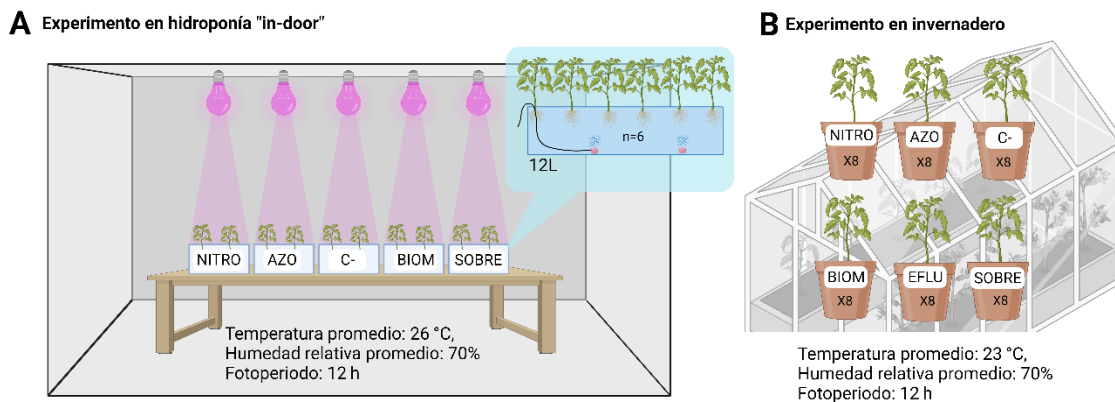


Figura 1. Esquema experimental para el ensayo en hidroponía (A) y en invernadero (B). NITRO: aplicación de nitrógeno mediante solución de Hoagland, AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter chroococum* y *Azospirillum sp*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del efluente del reactor donde se cultivó la comunidad microbiana autoensamblada fijadora de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar.

4.3.2 Montaje experimental en invernadero

Plántulas de tomate de la variedad UNAPAL-Maravilla (Estrada Salazar et al., 2004) de 20 días de germinadas fueron adquiridas en una plantuladora comercial ubicada en Candelaria, Valle del Cauca. Las plántulas fueron trasplantadas a bolsas plásticas con 3 Kg de suelo cada una. El suelo fue recolectado de los primeros 20 cm de un bosque con más de 30 años en proceso de restauración natural, situado junto a la Estación Experimental en el campus de la Universidad del Valle (3°22'23"N, 76°31'51"W; Cali, Colombia). El suelo fue desagregado manualmente simulando un proceso de mecanización. El experimento fue realizado en el invernadero de entomología de la Universidad del Valle con temperatura promedio de 23 °C ± 4°C, 70% ± 3 de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h. Se utilizó un diseño factorial con dos factores, el primer factor fue esterilidad del suelo (suelo esterilizado y suelo no esterilizado), y el segundo factor fue la fuente de nitrógeno con 6 niveles (BIOM, SOBRE, AZO, NITRO, C- de acuerdo a la descrito en la tabla 1) resultando en 12 tratamientos. Para cada uno de los tratamientos se usaron 8 réplicas, cada réplica consistió en una planta de tomate sembrada en una bolsa

plástica con 3 Kg de suelo. La esterilización del suelo se realizó mediante dos ciclos de autoclave a 121°C y 15 PSI durante 40 minutos cada uno.

Tabla 2. Características de los tratamientos y forma de aplicación

Suelo	Fuente de N - Descripción	Tratamiento	Aplicación
Suelo no esterilizado	El efluente del reactor es centrifugado a 5500 rpm por 30 minutos, el pellet es resuspendido en solución salina 0,85% y ajustado a una densidad óptica de 0,3 OD 600 nm (Hoefer Vision SP-2001)	NE-BIO*	Se aplicó semanalmente 10 mL del producto en drench a cada planta durante cuatro semanas.
	El efluente del reactor es centrifugado a 5082 g por 30 minutos, el sobrenadante es colectado, se determinó nitrógeno total (Hanna Instruments HI93767A-50) ($9,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y fue esterilizado.	NE-SOBRE*	Se aplicaron 265 mL semanalmente a cada planta durante 4 semanas. Esta cantidad se calculó para lograr un aporte de 12g de nitrógeno por planta, atendiendo a la demanda de nitrógeno para esta variedad, también se tomó en cuenta la cantidad de nitrógeno inicialmente disponible en el suelo utilizado.
	Biofertilizante comercial Dimazos® a base de <i>Azotobacter chroococum</i> y <i>Azospirillum sp.</i>	NE-AZOTO*	Se aplicó semanalmente 7,5 mL del producto en forma de drench a cada planta semanalmente durante cuatro semanas siguiendo la dosis recomendada por el fabricante.
	Fertilización nitrogenada con solución de Hoagland	NE-NITRO*	Se aplicaron 12,37 mL de solución al 100% semanalmente a cada planta durante 4 semanas. Esta cantidad se calculó para lograr un aporte de 12g de nitrógeno por planta, atendiendo a la demanda de nitrógeno para esta variedad, también se tomó en cuenta la cantidad de nitrógeno inicialmente disponible en el suelo utilizado.

	Solución de Hoagland modificada sin aporte de nitrógeno (<u>Gutiérrez et al., 2022</u>)	NE-C-	Se aplicaron 12,37 mL de solución al 100% sin aporte de nitrógeno semanalmente a cada planta durante 4 semanas
	El efluente del reactor es ajustado a una densidad óptica de 0,3 OD 600 nm (Hoefer Vision SP-2001)	NE-EFLU*	Se aplicó semanalmente 10 mL del producto en drench a cada planta durante cuatro semanas.
Suelo esterilizado	El efluente del reactor es centrifugado a 5500 rpm por 30 minutos, el pellet es resuspendido en solución salina 0,85% y ajustado a una densidad óptica de 0,3 OD 600 nm (Hoefer Vision SP-2001)	NE-BIO*	Se aplicó semanalmente 10 mL del producto en drench a cada planta durante cuatro semanas.
	El efluente del reactor es centrifugado a 5500 rpm por 30 minutos, el sobrenadante es colectado, se determinó nitrógeno total (Hanna Instruments HI93767A-50) ($9,8 \text{ mg}^* \text{mL}^{-1}$) y fue esterilizado.	NE-SOBRE*	Se aplicaron 265 mL semanalmente a cada planta durante 4 semanas. Esta cantidad se calculó para lograr un aporte de 12g de nitrógeno por planta, atendiendo a la demanda de nitrógeno para esta variedad, también se tomó en cuenta la cantidad de nitrógeno inicialmente disponible en el suelo utilizado.
	Biofertilizante comercial Dimazos® a base de <i>Azotobacter chroococum</i> y <i>Azospirillum sp.</i>	NE-AZOTO*	Se aplicó semanalmente 7,5 mL del producto en forma de drench a cada planta semanalmente durante cuatro semanas siguiendo la dosis recomendada por el fabricante.
	Fertilización nitrogenada con solución de Hoagland	NE-NITRO*	Se aplicaron 12,37 mL de solución al 100% semanalmente a cada planta durante 4 semanas. Esta cantidad se calculó para lograr un aporte de 12g de nitrógeno por planta, atendiendo a la demanda de nitrógeno para esta variedad, también se tomó en cuenta la cantidad de nitrógeno

			inicialmente disponible en el suelo utilizado.
	Solución de Hoagland modificada sin aporte de nitrógeno	NE-C-	Se aplicaron 12,37 mL de solución al 100% sin aporte de nitrógeno semanalmente a cada planta durante 4 semanas
	Efluente del reactor sin ningún tratamiento	NE-EFLU*	Se aplicó semanalmente 10 mL del producto en drench a cada planta durante cuatro semanas.

*Los macro y micronutrientes fueron aportados con solución de Hoagland (100%) modificada sin aporte de nitrógeno como lo describe Gutierrez et al, 2022.

4.3.3 Variables de respuesta

Para las plantas crecidas en hidroponía, a los 45 días después de trasplante (fase de crecimiento vegetativo) se midieron variables agronómicas como longitud del tallo, número de hojas, longitud de la raíz, peso fresco y clorofilas totales. Adicionalmente, se determinó la composición del microbioma rizosferico (sección 4.3.3). Para las plantas crecidas en invernadero, se midió altura de la planta y número de hojas semanalmente hasta el día 70 después de trasplante (DDT). Se midió la producción en peso fresco del fruto para cada tratamiento a los 70 DDT. Adicionalmente, se determinó la composición del microbioma rizosferico (sección 4.3.3) a los 35 DDT (fase de crecimiento vegetativo).

4.3.4 Extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático

Con el fin de determinar si los microorganismos presentes en la comunidad autoensamblada son capaces de asociarse con la planta y colonizar la rizosfera, se determinó la composición microbiana de la rizosfera para el tratamiento BIOM. Se usó como punto de comparación los tratamientos AZO y C-. Para el caso de las plantas crecidas en suelo, cada planta (tres plantas por tratamiento) se agitó vigorosamente para eliminar los agregados grandes del suelo. El suelo que permaneció en las raíces se consideró como el suelo rizosférico y fue colectado siguiendo el protocolo de Lundberg et al. (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, las raíces (10 g de peso fresco), con el suelo de rizosfera asociado, se colocaron en tubos estériles de 50 ml y se trataron con

30 ml de buffer fosfato 1X más Tween 20® al 2 % (v/v); luego, cada tubo se agitó durante 10 min. Después de eso, las suspensiones se centrifugaron durante 5 minutos a 7200g, se descartó el sobrenadante y el pellet fue usado como material de partida para la extracción de ADN.

Para las plantas crecidas en hidroponía, los microorganismos rizosfericos fueron recolectados siguiendo la metodología de (Barillot et al., 2013) con algunas modificaciones. Brevemente, se retiraron del sistema 3 plantas de cada tratamiento, las raíces (10 g de peso fresco), se colocaron en tubos estériles de 50 ml al cual se añadió 25 mL de solución salina al 0.85 % y se añadió tween 80 al 0.01 % (v/v). Posteriormente, se agitó durante 90 minutos a 300 rpm para desprender las bacterias adheridas a la raíz. La fase líquida se centrifugó a 150 g durante 10 minutos, el sobrenadante se filtró (1 mm), se transfirió a otro frasco estéril y fue centrifugado 10000 g por 30 minutos (UNIVERSAL 320 - Hettich), se descartó el sobrenadante y el pellet fue usado como material de partida para la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se usó el kit NucleoSpin Soil (Macherey–Nagel GmbH, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se midió la calidad y cantidad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría usando Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU).

Las regiones del gen V3-V4 16S rRNA (341F - 805R) fueron secuenciadas por Mr.DNA Lab (Molecular Research LP Co, TX, USA) utilizando una plataforma Illumina MiSeq. Los datos de secuenciación fueron analizados utilizando QIIME2 v 2023.9 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). La eliminación de ruido, la desreplificación de las secuencias y el filtrado de quimeras con el método de consenso se realizaron utilizando DADA2 (Callahan et al., 2016) dentro de QIIME2. La asignación taxonómica de las variantes de secuencia de amplicones (ASV) (97% de identidad de secuencia), se realizó utilizando el complemento “fit-classifier-naïve-Bayes”, frente a la base de datos de referencia SILVA 138.

4.3.5 Análisis estadístico

Para las variables de seguimiento de los bioreactores se realizó un análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$), se probaron los supuestos de normalidad mediante prueba de Shapiro-Wilks y homogeneidad de varianzas mediante prueba de Bartlett. Se realizaron análisis de comparaciones de medias usando Tukey ($p < 0,05$). Todos los análisis fueron realizados usando el programa R (R Core Team, 2022).

4.4 Resultados

4.4.1 Plantas crecidas en hidroponía

Plantas de tomate cultivadas en hidroponía mostraron que la aplicación de la biomasa microbiana en la solución nutritiva logra un crecimiento significativamente igual al que se obtiene con una fertilización usando nitrógeno (210 ppm) (Figura 2). El uso del producto comercial con *Azotobacter* y *Azospirillum*, si bien mostró un crecimiento significativamente mayor al control negativo (C-), no fue suficiente para igualar el control positivo con nitrógeno (NITRO). Estos resultados se pueden apreciar en las fotografías de las plantas de tomate (figura 3) donde es evidente un mayor crecimiento aéreo y desarrollo de raíz en las plantas de los tratamientos BIOM y NITRO.

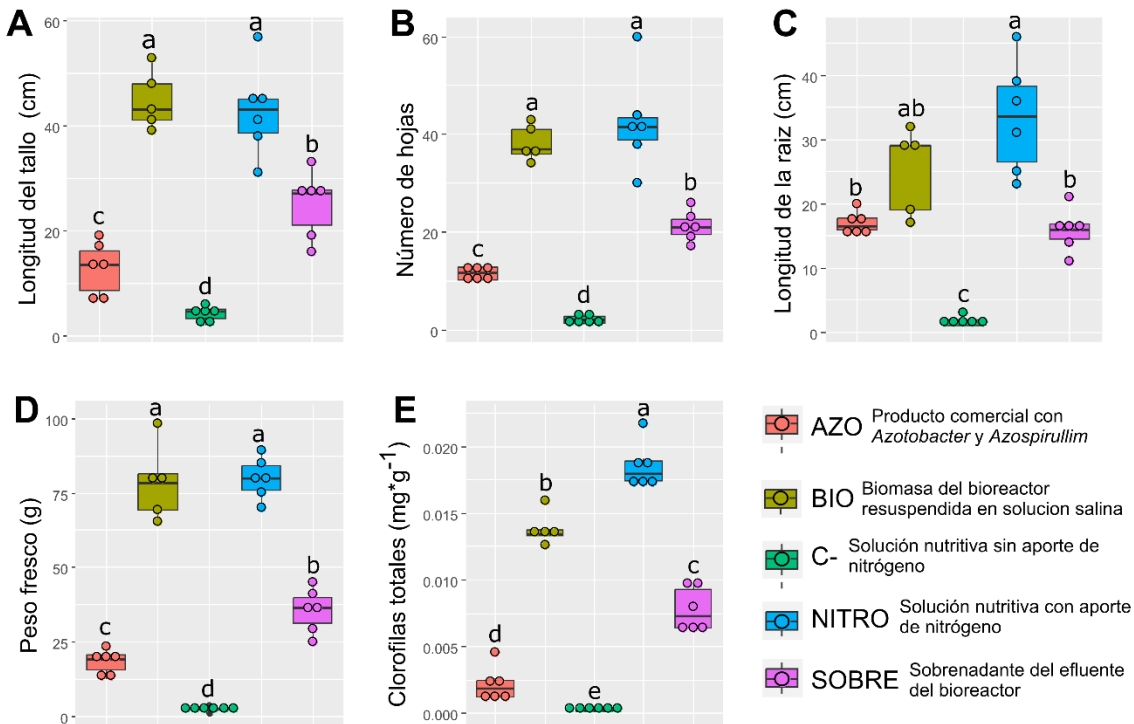


Figura 2. Mediciones en plantas de tomate de 45 días de crecimiento en hidroponía. A: longitud del tallo, B: número de hojas. C: longitud de la raíz, D: peso fresco de la planta, E: contenido de clorofilas. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey $p < 0,05$).

Por otra parte, las plantas de los tratamientos AZO y SOBRE presentan un bajo desarrollo foliar, poco crecimiento de la raíz y síntomas de clorosis. Las plantas del control, negativo (C-) solamente desarrollaron un par de hojas verdaderas, evidenciando la importancia del nitrógeno. La figura 4 muestra fotografías microscópicas de raíces de tomate del tratamiento BIOM y C-, donde se aprecia la formación de biopelículas sobre la superficie de la raíz en las plantas del tratamiento BIOM.

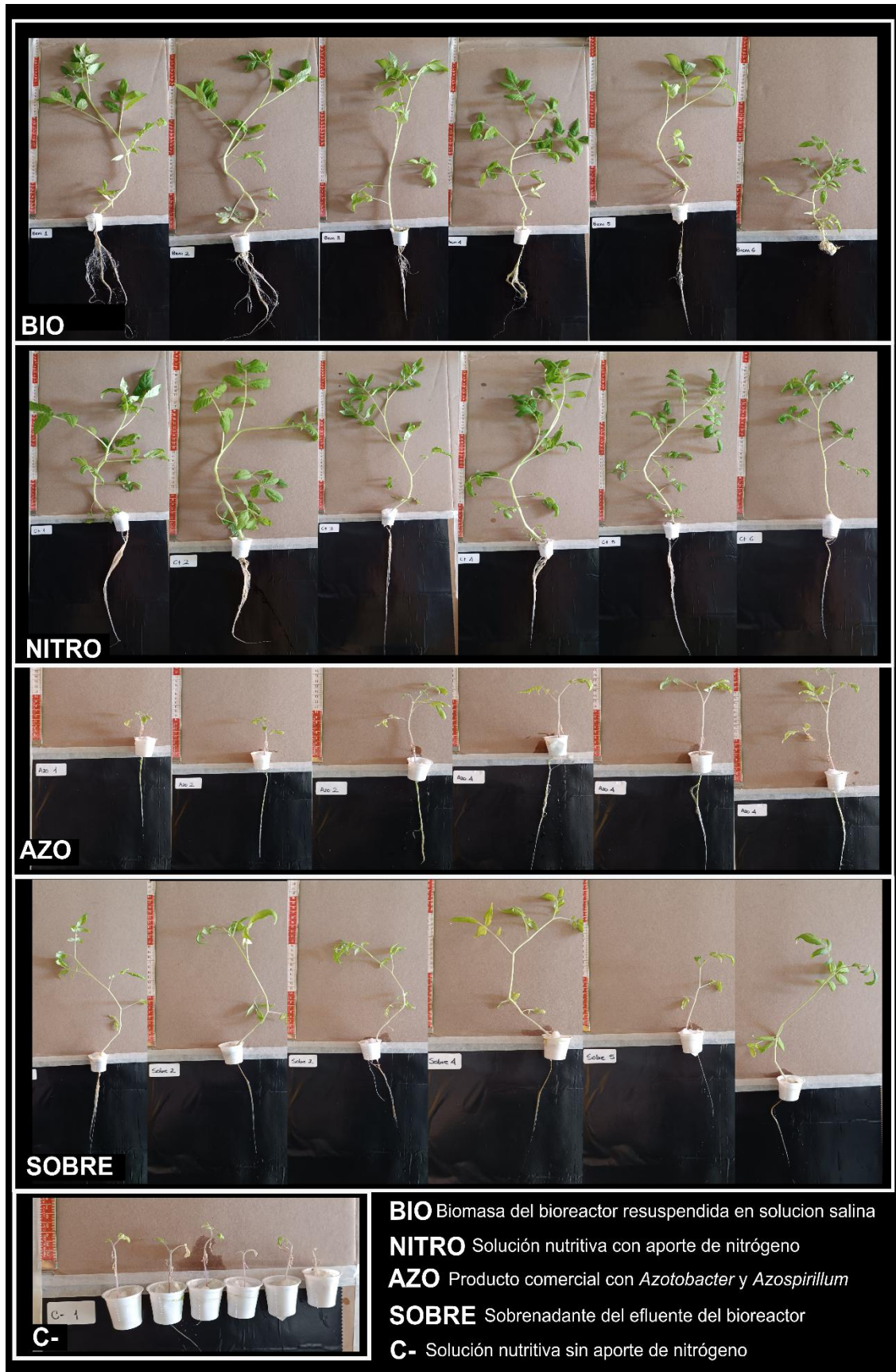


Figura 3. Fotografías de plantas de tomate de 45 días de crecimiento en hidroponía.

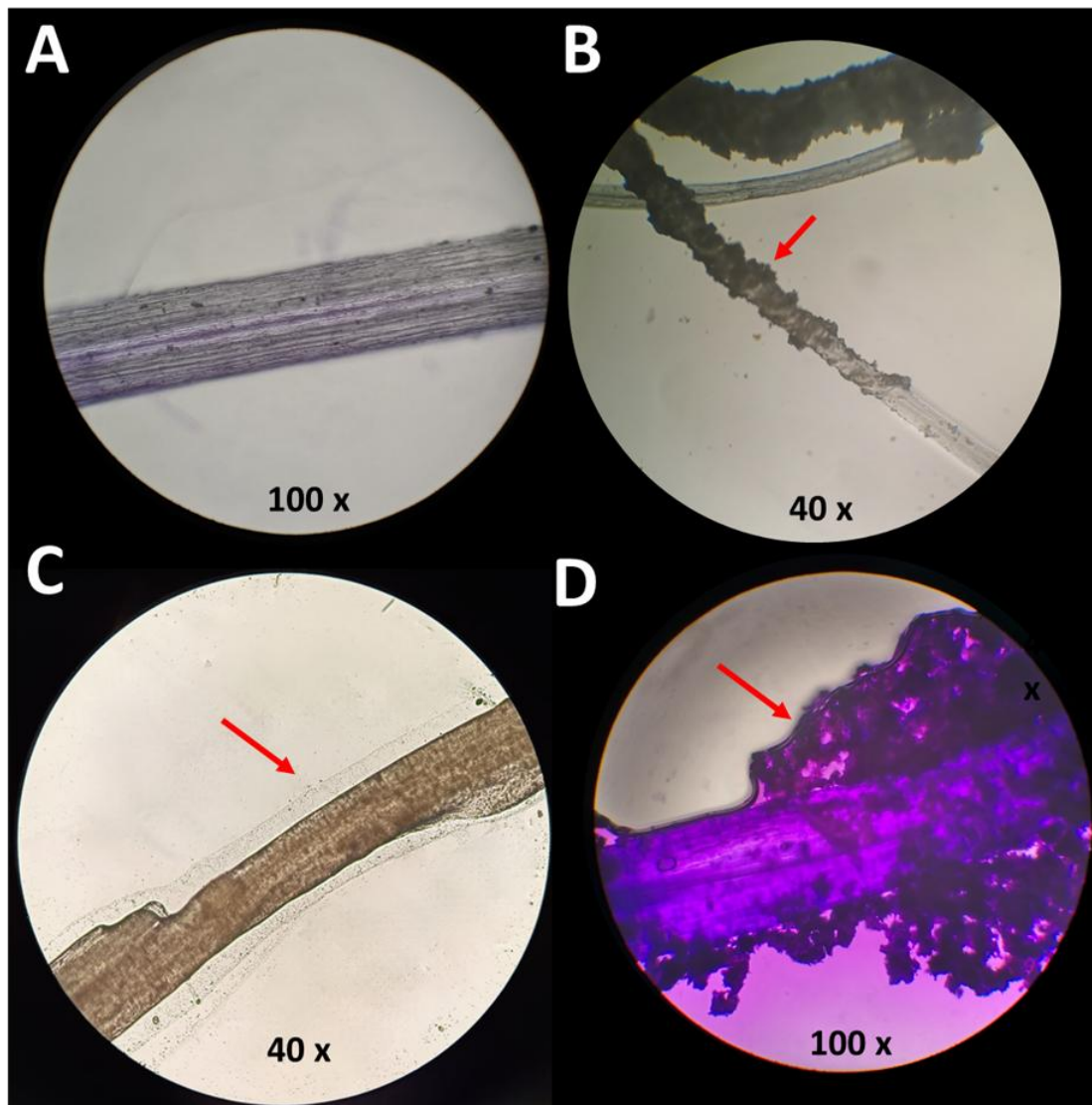


Figura 4. Fotografías microscópicas de raíces de plantas de tomate del control negativo sin aporte de nitrógeno (A) y plantas inoculadas con la biomasa resuspendida en solución salina (B-C-D).

4.4.2 Plantas crecidas en invernadero

Los resultados muestran que la esterilización del suelo afecta significativamente la producción para el control positivo (NITRO) para el sobrenadante (SOBRE) y para el control negativo (C-) comparado con suelo no esterilizado (figura 5). Este efecto no se

evidencia en los demás tratamientos que tienen aplicación de microorganismos (AZO, BIOM y EFLU). Se observa que se alcanza una producción igual al control con nitrógeno químico usando directamente el efluente del reactor tanto en suelo esterilizado como en suelo sin esterilizar.

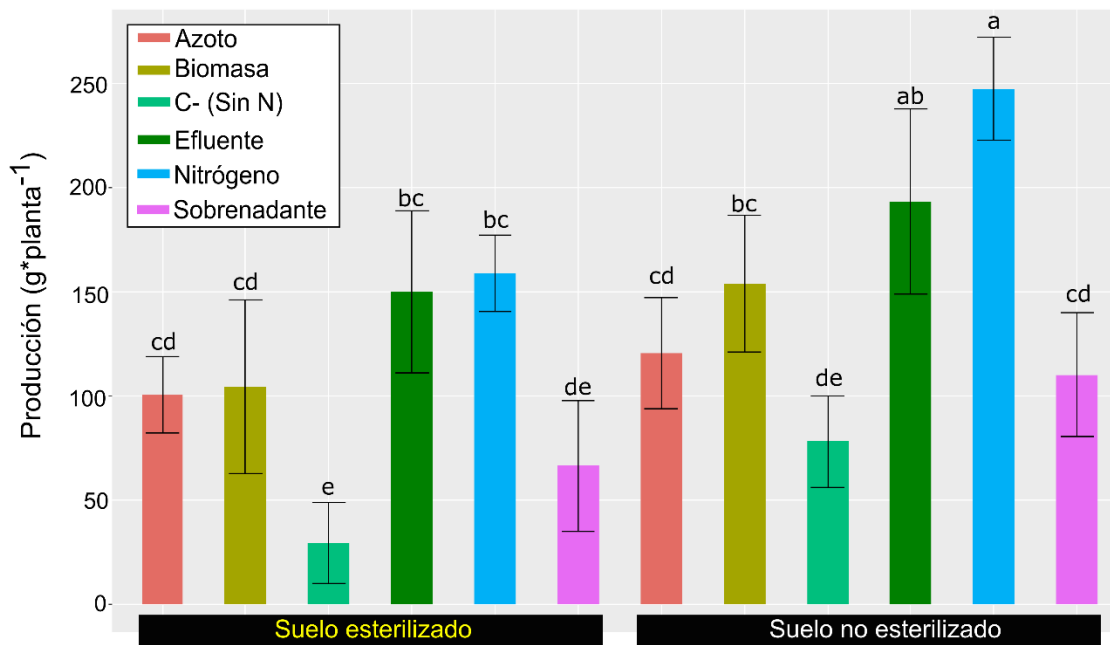


Figura 5. Producción en peso fresco de los frutos de tomate a los 45 DDS. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey $p < 0,05$). $n = 8$

La figura 6 muestra fotografías de plantas de tomate de cada tratamiento a los 35 DDS, allí se aprecia de forma visual diferencias en el crecimiento. La figura 7A muestra el crecimiento en términos de altura de la planta durante el tiempo que duró el experimento. Se aprecia un menor crecimiento en las plantas sembradas en suelo esterilizado, sin embargo, las diferencias no son tan contundentes como se aprecia en la producción (figura 5).



Figura 6. Fotografías de plantas de tomate de los diferentes tratamientos crecidas en invernadero a los 35 DDS. AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter* y *Asospirillum*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del reactor fijador de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar, NE: suelo no esterilizado, E: suelo esterilizado.

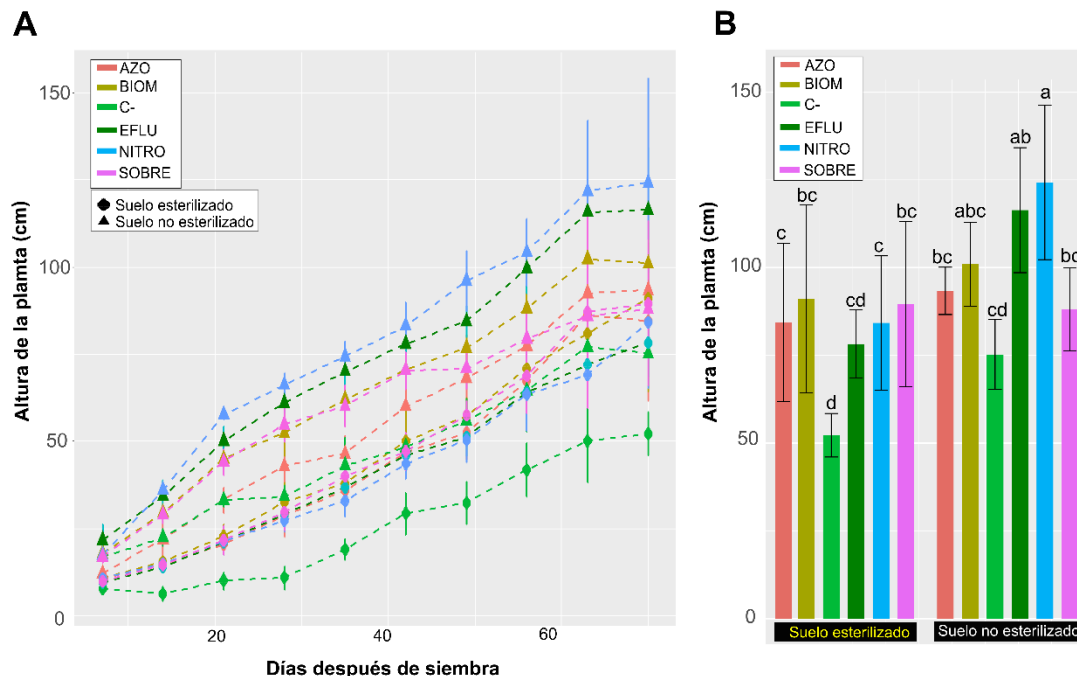


Figura 7. Altura de la planta durante el tiempo de evaluación del experimento (A) y a los 70 DDS (B). Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Tukey $p < 0,05$). AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter* y *Asospirillum*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del reactor fijador de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar.

4.4.3 Microbioma rizosférico

Los resultados descritos en la figura 8 muestran que para el experimento de hidroponía para el tratamiento AZO hay una abundancia de 24,7% de *Azospirillum*, mientras que *Azotobacter* no fue detectado. Para el tratamiento BIOM los taxones más abundantes fueron *Pseudomonas* (20,7%), *Exiguobacterium* (11,9%) y *Sphingobium* (6,8%). Para el experimento en invernadero se aprecia una alta diversidad de microorganismos asociados a la rizosfera en todos los tratamientos. El tratamiento AZO solo registra una abundancia de 0,2% de *Azospirillum*, mientras que *Azotobacter* no fue detectado dentro de la lista de los más abundantes.

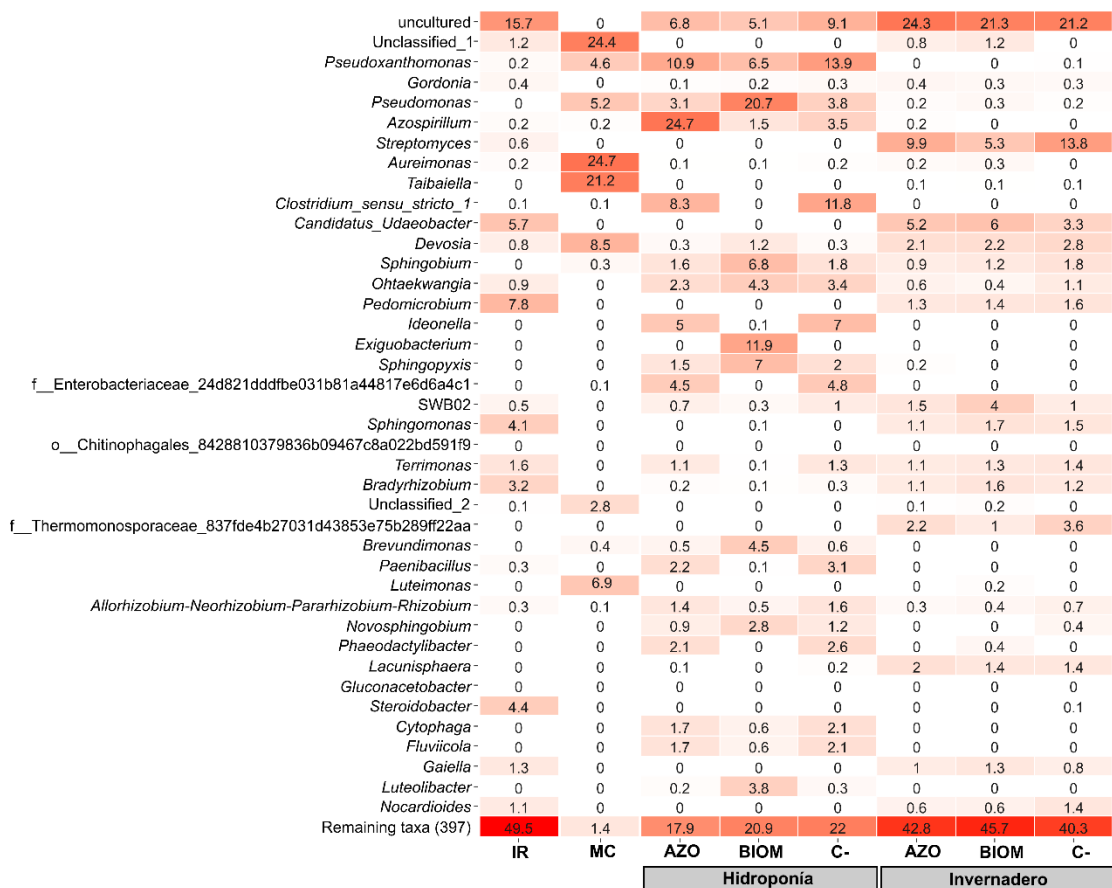


Figura 8. Gráfico de calor con valores de abundancia relativa de los 42 géneros más abundantes en las muestras. Tonos rojos más intensos indican una alta abundancia y menos intensos una baja abundancia. IR: inóculo rizosferico. MC: mezcla de AGVs de cerdo, AZO: mezcla de AGVs sintética, AZO: aplicación de un producto comercial a base de *Azotobacter* y *Asospirillum*, BIOM: aplicación de la biomasa centrifugada del reactor de fijación de nitrógeno, SOBRE: aplicación del sobrenadante obtenido del reactor fijador de nitrógeno, C-: control negativo sin aporte de nitrógeno, EFLU: aplicación del efluente del reactor sin centrifugar.

4.5 Discusión

Los resultados muestran que, tanto en hidroponía como en suelo, la inoculación de las plantas de tomate con la comunidad autoensamblada ya sea la biomasa centrifugada o directamente el efluente, permite una mayor producción y crecimiento con respecto a un control negativo. Se alcanzan valores iguales a los obtenidos con una fertilización química convencional.

Es interesante que en el tratamiento AZO, no aparece *Azotobacter* en los análisis de diversidad. *Azospirillum* a pesar de que aparece con una abundancia del 24,7%, la fijación de nitrógeno no parece ser suficiente para mantener un crecimiento normal de la planta. La desaparición de *Azotobacter* podría ser debida a múltiples causas como no adaptación al hospedante, poca capacidad de competencia en la rizosfera, falta de adaptación al sistema de cultivo, entre otras.

Azospirillum se caracteriza por tener un metabolismo oxidativo microaerófilo que es óptimo a 0,4% de oxígeno disuelto (Alexandre, 2015). Además, es capaz de detectar gradientes de oxígeno (aerotaxis) para identificar y moverse hacia espacios con baja concentración de oxígeno (Chemotaxis in *Azospirillum* | SpringerLink, s. f.). Estas dos características hacen que posiblemente esta bacteria no sea recomendable como fijador de nitrógeno en sistemas hidropónicos con alta concentración de oxígeno disuelto. Sin embargo, se ha reportado su capacidad de promoción de crecimiento cuando se aplica nitrógeno en la solución nutritiva (Benavides et al., 2023).

Para el tratamiento BIOM en hidroponía los resultados sugieren que hay algunos taxones que la planta recluta a partir de la comunidad inoculada como *Pseudomonas* (20,7%), y *Sphingobium* (6,8%). Aparece también *Exiguobacterium* (11,9%) como el segundo más abundante,. Sin embargo, tiene una abundancia de cero en la comunidad autoensamblada (MC). Podría pensarse que es reclutado a partir del ambiente, pero no aparece en los otros dos tratamientos. La otra posibilidad es que estaba en una muy baja abundancia y la resolución del 16s no lo detecto, pero a pesar de estar poco abundante, fue capaz de prosperar en la rizosfera y alcanzar una abundancia de 11,9%.

La literatura muestra que microorganismos pertenecientes a *Pseudomonas* sp. tienen la capacidad de fijar nitrógeno y han sido identificados en múltiples especies de cultivos de interés comercial (Islam et al., 2013; Li et al., 2017). Por otra parte, no hay reportes que muestren que *Exiguobacterium* sp. ni *Sphingobium* sp. son capaces de fijar nitrógeno. Sin embargo, si es bien sabido de su capacidad como promotores de crecimiento por múltiples mecanismos como producción de ácido indol-acético, solubilización de fosfatos o formación de sideróforos (Boss et al., 2022; Kasana & Pandey, 2018; Pandey, 2020).

Adicionalmente, para el experimento de hidroponía, los resultados muestran que hay otros taxones que son abundantes en el C- y AZO pero que desaparecen en BIOM, como *Clostridium_senso_stricto_1*. Un comportamiento similar ocurre con *Pseudoxantomonas sp.* y *Paenibacillus sp.*, los cuales disminuyen su abundancia en BIOM con respecto al control no inoculado (C-). Esto sugiere que la aplicación de la comunidad autoensamblada no solamente aporta fijadores de nitrógeno, sino que posiblemente están involucrados otros mecanismos de promoción de crecimiento e interacciones ecológicas que en su conjunto hacen que la planta tenga un buen crecimiento. En este sentido, es vital avanzar en técnicas que permitan poder entender todas estas interacciones.

Es importante recalcar que a pesar de que las plantas usadas inicialmente para obtener el inoculo de inicio para todo el proceso de enriquecimiento y selección no eran tomate, y a pesar de que la comunidad fue cultivada con fuentes de carbono que no son las más comunes en la rizosfera, los microorganismos son capaces de responder a las plantas de tomate. Esto remarca la versatilidad metabólica de una comunidad autoensamblada en términos de poder adaptarse no solo a las condiciones de cultivo de la planta, sino también a la misma planta.

Usar el sobrenadante en hidroponía, si bien genera un crecimiento significativamente mayor al control negativo sin nitrógeno. Se esperaba que alcanzara unos resultados similares a usar nitrógeno químico, teniendo en cuenta que ambos tratamientos en principio tienen la misma cantidad de nitrógeno aplicado. Sin embargo, para el sobrenadante la medición que se realizó fue solamente nitrógeno total, y con base en ello se realizó el cálculo del aporte final.

Las plantas solamente asimilan nitrógeno en forma de nitrato o amonio, y la proporción de estos también es importante, por lo que además de la medición de nitrógeno total, es conveniente medir las formas de nitrógeno presentes en el sobrenadante. Es posible también que dentro de ese nitrógeno total haya formas orgánicas del nitrógeno. Por otra parte, la medición de nitrógeno total en el sobrenadante fue realizada antes de esterilizar, es posible que durante el proceso de esterilización se haya perdido nitrógeno por volatilización. Finalmente es importante mencionar que en el sobrenadante aún se mantienen AGVs que no fueron consumidos, y hasta el momento es desconocido el efecto que estas moléculas presentes en la solución nutritiva puedan tener sobre el crecimiento

de las plantas. Las razones anteriormente expuestas podrían explicar el hecho de que el sobrenadante lo generara los efectos esperados, sin embargo, es un primer punto de partida para seguir trabajando en las metodologías que permitan mejorar los resultados.

Para el experimento de invernadero, los taxones presentes en el inoculante no son abundantes en la rizosfera, sin embargo, la inoculación si genera un cambio en la composición microbiana en general, con ligeros aumentos en algunos taxones y descensos en otros y esto está asociado con una mejor producción. Otros estudios en tomate han mostrado que la inoculación de una comunidad autoensamblada cambia el microbioma rizosferico, aumenta la diversidad y promueve el crecimiento de las plantas (Gutiérrez et al., 2022).

El hecho de que usar el efluente directamente sea mejor que la biomasa centrifugada puede obedecer a dos razones, lo primero es que en el efluente aun se mantienen algunos de los nutrientes del medio de cultivo y lo segundo es que además de las bacterias y el nitrógeno que pueda existir a nivel extracelular, allí también están todos los metabolitos secundarios que se hayan podido producir durante el proceso de fermentación. En este sentido, a nivel de aplicabilidad práctica, puede ser más ventajoso formular el aplicar el producto directamente.

4.6 Conclusiones

En resumen, los resultados revelan que la inoculación de plantas de tomate con una comunidad autoensamblada, ya sea mediante biomasa centrifugada o efluente, mejora significativamente la producción y crecimiento, equiparando resultados a la fertilización química convencional.

Aunque el tratamiento AZO no muestra *Azotobacter sp.*, destaca la importancia de considerar la adaptación al hospedante. En BIOM, taxones como *Pseudomonas sp.* y *Sphingobium sp.* sugieren reclutamiento, resaltando la versatilidad metabólica de la comunidad. La aplicación de la comunidad microbiana cultivada en los reactores no solo aporta fijadores de nitrógeno, sino también otros mecanismos de promoción de crecimiento. La variación de taxones en comparación con el control indica interacciones ecológicas complejas.

La adaptabilidad de la comunidad a las plantas de tomate subraya su versatilidad metabólica. Se sugiere evaluar detalladamente las formas de nitrógeno en el sobrenadante y considerar posibles pérdidas durante la esterilización. En el invernadero, la inoculación genera cambios en la composición microbiana asociados con mejor producción, respaldando la aplicabilidad práctica del efluente directo. En conjunto, estos hallazgos proporcionan información valiosa sobre la eficacia y complejidades de la comunidad autoensamblada en el cultivo de tomate, destacando la necesidad de investigaciones adicionales para optimizar y comprender estos procesos.

5.Recomendaciones y consideraciones finales

Los hallazgos obtenidos en este estudio indican la presencia de una sorprendente diversidad de microorganismos posiblemente fijadores de nitrógeno, algunos desconocidos, que podrían albergar un potencial biotecnológico significativo. La aparición de microorganismos no clasificados sugiere la dificultad de obtenerlos mediante cultivos puros. Sin embargo, el presente trabajo destaca la viabilidad de cultivar estos microorganismos en bioreactores, lo que sugiere que las condiciones propicias para su desarrollo podrían depender de las asociaciones que puedan formar con otros organismos en un entorno controlado. Este fenómeno resalta la importancia de adoptar un enfoque basado en la teoría ecológica de comunidades microbianas en donde la bioprospección no se hace a partir de la identidad de los microorganismos sino a partir de la función que son capaces de llevar a cabo en un contexto de comunidad microbiana.

La valorización de los ácidos grasos volátiles (AGVs) derivados de residuos porcinos se revela como una opción altamente prometedora para el cultivo de microorganismos fijadores de nitrógeno en biorreactores. Más allá de la mera producción de biomasa microbiana, este enfoque ha demostrado la obtención de nitrógeno combinado en el sobrenadante, sugiriendo la posibilidad de emplear los biorreactores fijadores de nitrógeno como biofábricas de nitrógeno combinado. Además, este proceso puede integrarse de manera eficiente en un contexto de biorefinería al aprovechar los AGVs generados a través de la digestión anaerobia de residuos porcinos. Este estudio representa un enfoque pionero en esta área emergente, proporcionando valiosa información inicial. Sin embargo, se reconoce que el camino hacia la optimización del proceso aún se encuentra en sus primeras etapas. Aspectos cruciales, como la evaluación de diferentes concentraciones de AGVs y modos de operación de los biorreactores, necesitan una atención más detallada. La variabilidad en la composición y cantidad de AGVs podría influir directamente en la

eficiencia del cultivo microbiano y la producción de nitrógeno combinado, por lo que es esencial investigar a futuro cuidadosamente estas variables para maximizar los beneficios del sistema. Además, se vislumbra la oportunidad de explorar otros bioprocesos conectados a la fijación de nitrógeno. La posibilidad de considerar la integración con procesos como el cultivo de microalgas o la utilización de otros microorganismos de interés industrial amplía aún más el potencial de este enfoque.

Este estudio propone la utilización de inoculantes compuestos por una variedad de microorganismos como una alternativa a los biofertilizantes convencionales que se formulan a partir de cultivos puros. Aunque esta alternativa demuestra su eficacia a nivel experimental, se presentan desafíos legales que podrían restringir su aplicación.

En el contexto colombiano, existe un requisito mínimo de pureza del microorganismo en los productos formulados, y cumplir con este criterio se vuelve más complejo en el caso de inoculantes compuestos. Para abordar este problema, sería esencial incorporar técnicas de secuenciación de nueva generación, las cuales permiten determinar la diversidad de especies presentes y su abundancia en el inoculante.

No obstante, la implementación de estas técnicas conlleva desafíos adicionales, ya que no son pruebas de rutina y requieren la disponibilidad de equipos especializados y personal altamente calificado. Esto no solo añade una barrera logística, sino también un costo adicional a la aplicación de los inoculantes compuestos. En este contexto, resulta imperativo revisar las normativas existentes para adecuarlas a la realidad de estas nuevas tecnologías agrícolas.

La revisión de las normativas sería fundamental para fomentar la adopción de inoculantes compuestos en la práctica agrícola, ya que permitiría la flexibilización de los requisitos de pureza y la integración de métodos avanzados de caracterización microbiana. Además, se podría considerar la creación de protocolos específicos que faciliten la implementación de técnicas de secuenciación de nueva generación, promoviendo la accesibilidad y la estandarización de estas herramientas

Bibliografía

- Agnihotri, S., Yin, D.-M., Mahboubi, A., Sapmaz, T., Varjani, S., Qiao, W., Koseoglu-Imer, D. Y., & Taherzadeh, M. J. (2022). A Glimpse of the World of Volatile Fatty Acids Production and Application: A review. *Bioengineered*, 13(1), 1249-1275. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996044>
- Alexandre, G. (2015). Chemotaxis in *Azospirillum*. En F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (Eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols* (pp. 101-114). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_6
- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2021). Status of biofertilizer research, commercialization, and practical applications: A global perspective. *Biofertilizers: Volume 1: Advances in Bio-inoculants*, 191-208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00017-8>
- Aloo, B. N., Tripathi, V., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2022). Plant growth-promoting rhizobacterial biofertilizers for crop production: The past, present, and future. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1002448>
- Amareesan, N., Dharumadurai, D., & Babalola, O. O. (2023). *Agricultural Microbiology Based Entrepreneurship Making Money from Microbes* (N. Amareesan, D. Dharumadurai, & O. Babalola, Eds.; 1.ª ed.). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-5747-5>
- Ambrosio, R., Ortiz-Marquez, J. C. F., & Curatti, L. (2017). Metabolic engineering of a diazotrophic bacterium improves ammonium release and biofertilization of plants and

microalgae. *Metabolic Engineering*, 40, 59-68.

<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.01.002>

Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., & Cetecioglu, Z. (2018). Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges.

Bioresource Technology, 268, 773-786. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.042>

Barillot, C. D. C., Sarde, C. O., Bert, V., Tarnaud, E., & Cochet, N. (2013). A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Annals of Microbiology*, 63(2), 471-476.

<https://doi.org/10.1007/s13213-012-0491-y>

Batista, M. B., Brett, P., Appia-Ayme, C., Wang, Y.-P., & Dixon, R. (2021). Disrupting hierarchical control of nitrogen fixation enables carbon-dependent regulation of ammonia excretion in soil diazotrophs. *PLOS Genetics*, 17(6), e1009617.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009617>

Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*,

98(18), 3535-3546. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.066>

Benavides, H. S., Uribe-Velez, D., & Restrepo-Díaz, H. (2023). Evaluation of brassinosteroids and plant growth-promoting bacteria on the growth and yield of *Lactuca sativa* L. under soilless cultivation conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 46(18), 4438-4453.

<https://doi.org/10.1080/01904167.2023.2232390>

Bicer, Y., Dincer, I., Vezina, G., & Raso, F. (2017). Impact Assessment and Environmental Evaluation of Various Ammonia Production Processes. *Environmental Management*,

59(5), 842-855. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0831-6>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A.,

Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K.,

Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M.,

- Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bonilla Buitrago, R., Gonzalez de Bashan, L. E., & Pedraza, R. O. (2021). *Rol de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible*. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7405019>
- Boss, B. L., Wanees, A. E., Zaslów, S. J., Normile, T. G., & Izquierdo, J. A. (2022). Comparative genomics of the plant-growth promoting bacterium *Sphingobium* sp. Strain AEW4 isolated from the rhizosphere of the beachgrass *Ammophila breviligulata*. *BMC Genomics*, 23(1), 508. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08738-8>
- Branthôme, F.-X. (2023). *Worldwide (total fresh) tomato production in 2021—Tomato News*. *Tomato news*. https://www.tomatonews.com/en/worldwide-total-fresh-tomato-production-in-2021_2_1911.html
- Bueno Batista, M., & Dixon, R. (2019). Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. *Biochemical Society Transactions*, 47(2), 603-614. <https://doi.org/10.1042/BST20180342>
- Burton-Freeman, B., & Reimers, K. (2011). Tomato Consumption and Health: Emerging Benefits. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 5(2), 182-191. <https://doi.org/10.1177/1559827610387488>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Chang, C.-Y., Bajić, D., Vila, J. C. C., Estrela, S., & Sanchez, A. (2023). Emergent coexistence in multispecies microbial communities. *Science*, 381(6655), 343-348.

<https://doi.org/10.1126/science.adg0727>

Chemotaxis in Azospirillum | SpringerLink. (s. f.). Recuperado 24 de enero de 2024, de

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-06542-7_6

Clark, D. P., & Cronan, J. E. (2005). Two-Carbon Compounds and Fatty Acids as Carbon Sources. *EcoSal Plus*, 1(2), 10.1128/ecosalplus.3.4.4.

<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.4>

Clavijo-Salinas, J. C., Fuertez, J., Cadavid-Rodríguez, L. S., & Sanabria, J. (2020). Compatible Technologies to Anaerobic Digestion for the Integral Valorization of Organic Waste. En Z. A. Zakaria, R. Boopathy, & J. R. Dib (Eds.), *Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches* (pp. 185-202). Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-39137-9_9

Costa, J. M., & Heuvelink, E. (2018). The global tomato industry. | Tomatoes. En *Tomatoes* (pp. 1-26). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/9781780641935.0001>

DANE. (2023). *Boletín Técnico N° 130. Insumos y factores de la producción Boletín de agropecuaria Abril 2023.*

https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_abr_2023.pdf

Diaz-Colunga, J., Lu, N., Sanchez-Gorostiaga, A., Chang, C.-Y., Cai, H. S., Goldford, J. E.,

Tikhonov, M., & Sánchez, Á. (2022). Top-down and bottom-up cohesiveness in microbial community coalescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(6), e2111261119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111261119>

Díaz-García, L., Huang, S., Spröer, C., Sierra-Ramírez, R., Bunk, B., Overmann, J., & Jiménez, D. J. (2021). Dilution-to-Stimulation/Extinction Method: A Combination Enrichment

- Strategy To Develop a Minimal and Versatile Lignocellulolytic Bacterial Consortium.
Applied and Environmental Microbiology, 87(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.02427-20>
- Einsle, O., & Rees, D. C. (2020). Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. *Chemical Reviews*, 120(12), 4969-5004.
<https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.0C00067>
[_0020.GIF](https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.0C00067/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CROC00067_0020.GIF)
- Environment, U. N. (2017, septiembre 26). *Solid waste management*. UNEP - UN Environment Programme. <http://www.unep.org/explore-topics/resource-efficiency/what-we-do/cities/solid-waste-management>
- Estrada Salazar, E. I., García Dávila, M. A., Baena García, D., Gutierrez F., A., Cardozo Conde, C. I., & Sánchez, M. S. (2004). *Cultivo de tomate: Variedad UNAPAL maravilla*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/51973>
- Estrela, S., Vila, J. C. C., Lu, N., Bajić, D., Rebolleda-Gómez, M., Chang, C.-Y., Goldford, J. E., Sanchez-Gorostiaga, A., & Sánchez, Á. (2022). Functional attractors in microbial community assembly. *Cell Systems*, 13(1), 29-42.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2021.09.011>
- FAO (Ed.). (2019). *The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO. (2020). *Livestock and environment statistics: Manure and greenhouse gas emissions*. 14.
- FAO. (2022a). *ENVIRONMENTAL PERFORMANCE OF PIG SUPPLY CHAINS*.
www.fao.org/partnerships/leap/en
- FAO. (2022b). *World fertilizer trends and outlook to 2022*. 40. <https://doi.org/10.4060/ca6746en>
- FAOSTAT. (2023a). *Agricultural production statistics 2000–2022*.
- FAOSTAT. (2023b). *Fertilizers by nutrient*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RFN/visualize>

- Fujita, Y., Matsuoka, H., & Hirooka, K. (2007). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular Microbiology*, 66(4), 829-839. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x>
- Fúnez Guerra, C., Reyes-Bozo, L., Vyhmeister, E., Jaén Caparrós, M., Salazar, J. L., & Clemente-Jul, C. (2020). Technical-economic analysis for a green ammonia production plant in Chile and its subsequent transport to Japan. *Renewable Energy*, 157, 404-414. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.041>
- Galloway, J. N., Bleeker, A., & Erisman, J. W. (2021). The Human Creation and Use of Reactive Nitrogen: A Global and Regional Perspective. *Annual Review of Environment and Resources*, 46(1), 255-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012420-045120>
- Genq, J. B., Chen, F. R., Ji, Q., & Liu, B. Y. (2021). Network connectedness between natural gas markets, uncertainty and stock markets. *Energy Economics*, 95. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2020.105001>
- Giroto, F., & Cossu, R. (2017). Animal Waste: Opportunities and Challenges. En E. Lichtfouse (Ed.), *Sustainable Agriculture Reviews* (pp. 1-13). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48006-0_1
- González-Andrés, F., & James, E. (Eds.). (2016). *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6>
- Rodriguez-Gonzalez, C., Ospina-Betancourth, C., & Sanabria, J. (2021). High Resistance of a Sludge Enriched with Nitrogen-Fixing Bacteria to Ammonium Salts and Its Potential as a Biofertilizer. *Bioengineering*, 8(5), 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050055>
- Gutiérrez, C. F., Rodríguez-Romero, N., Egan, S., Holmes, E., & Sanabria, J. (2022). Exploiting the Potential of Bioreactors for Creating Spatial Organization in the Soil Microbiome: A Strategy for Increasing Sustainable Agricultural Practices. *Microorganisms*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071464>

- Gutierrez, C. F., Sanabria, J., Raaijmakers, J. M., & Oyserman, B. O. (2020). Restoring degraded microbiome function with self-assembled communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(12), fiae225. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae225>
- Harirchi, S., Wainaina, S., Sar, T., Nojoumi, S. A., Parchami, M., Parchami, M., Varjani, S., Khanal, S. K., Wong, J., Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2022). Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): A review. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986>, 13(3), 6521-6557. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986>
- Islam, Md. R., Sultana, T., Joe, M. M., Yim, W., Cho, J.-C., & Sa, T. (2013). Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12), 1004-1015. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200141>
- Jing, X., Liu, X., Zhang, Z., Wang, X., Rensing, C., & Zhou, S. (2022). Anode respiration-dependent biological nitrogen fixation by *Geobacter sulfurreducens*. *Water Research*, 208, 117860. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117860>
- Joshi, S. K., & Gauraha, A. K. (2022). 24 - Global biofertilizer market: Emerging trends and opportunities. En R. Soni, D. C. Suyal, A. N. Yadav, & R. Goel (Eds.), *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy* (pp. 689-697). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91595-3.00024-0>
- K. Keerthana Ponni, A. M. (2021). Characterization of *Sinirhodobacter* sp., and *Bacillus zanthoxylifrom* Bio methanation plant with emphasis on its plant growth promotion(PGP). *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 13308-13318.
- Kang, D., Jacquiod, S., Herschend, J., Wei, S., Nesme, J., & Sørensen, S. J. (2020). Construction of Simplified Microbial Consortia to Degrade Recalcitrant Materials Based on

Enrichment and Dilution-to-Extinction Cultures. *Frontiers in Microbiology*, 10.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.03010>

Karapetyan, A. (2023). Application of biofertilizers in hydroponics: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 0(0), 1-15. <https://doi.org/10.1080/01904167.2023.2280159>

Kasana, R. C., & Pandey, C. B. (2018). Exiguobacterium: An overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), 141-156. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312273>

Kaur, H., Sharda, R., & Sharma, P. (2016). Effect of Hoagland solution for growing tomato hydroponically in greenhouse. *HortFlora Research Spectrum*, 5(4), 310-315.

Kayasth, M., Kumar, V., & Gera, R. (2014). Gordononia sp. sp.: A salt tolerant bacterial inoculant for growth promotion of pearl millet under saline soil conditions. *3 Biotech*, 4(5), 553-557. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0178-5>

Kranert, M., Kusch, S., Huang, J., & Fischer, K. (2012). Anaerobic Digestion of Waste. En A. Karagiannidis (Ed.), *Waste to Energy: Opportunities and Challenges for Developing and Transition Economies* (pp. 107-135). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2306-4_5

Kumar, A., & Samadder, S. R. (2020). Performance evaluation of anaerobic digestion technology for energy recovery from organic fraction of municipal solid waste: A review. *Energy*, 197, 117253. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117253>

Lawson, C. E., Harcombe, W. R., Hatzenpichler, R., Lindemann, S. R., Löffler, F. E., O'Malley, M. A., García Martín, H., Pflieger, B. F., Raskin, L., Venturelli, O. S., Weissbrodt, D. G., Noguera, D. R., & McMahon, K. D. (2019). Common principles and best practices for engineering microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 725-741. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0255-9>

Li, H.-B., Singh, R. K., Singh, P., Song, Q.-Q., Xing, Y.-X., Yang, L.-T., & Li, Y.-R. (2017). Genetic Diversity of Nitrogen-Fixing and Plant Growth Promoting Pseudomonas Species

- Isolated from Sugarcane Rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01268>
- Lü, F., Wang, Z., Zhang, H., Shao, L., & He, P. (2021). Anaerobic digestion of organic waste: Recovery of value-added and inhibitory compounds from liquid fraction of digestate. *Bioresource Technology*, 333, 125196. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125196>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meselmani, M. A. A. (2022). Nutrient Solution for Hydroponics. En *Recent Research and Advances in Soilless Culture*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101604>
- Monisha, K., Kalai Selvi, H., Sivanandhini, P., Sona Nachammai, A., Anuradha, C. T., Rama Devi, S., Kavitha Sri, A., Neya, N. R., Vaitheeswari, M., & Hikku, G. S. (2023). Hydroponics agriculture as a modern agriculture technique. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, Vol. 116(nr 1). <https://doi.org/10.5604/01.3001.0016.3395>
- Móring, A., Hooda, S., Raghuram, N., Adhya, T. K., Ahmad, A., Bandyopadhyay, S. K., Barsby, T., Beig, G., Bentley, A. R., Bhatia, A., Dragosits, U., Drewer, J., Foulkes, J., Ghude, S. D., Gupta, R., Jain, N., Kumar, D., Kumar, R. M., Ladha, J. K., ... Sutton, M. A. (2021). Nitrogen Challenges and Opportunities for Agricultural and Environmental Science in India. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2021.505347>
- Nakayasu, M., Takamatsu, K., Yazaki, K., & Sugiyama, A. (2023). Plant specialized metabolites in the rhizosphere of tomatoes: Secretion and effects on microorganisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 87(1), 13-20. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbac181>

- Ortiz-Marquez, J. C. F., Do Nascimento, M., & Curatti, L. (2014). Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories. *Metabolic Engineering*, 23, 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.03.002>
- Ortiz-Marquez, J. C. F., Do Nascimento, M., Dublan, M. de los A., & Curatti, L. (2012). Association with an Ammonium-Excreting Bacterium Allows Diazotrophic Culture of Oil-Rich Eukaryotic Microalgae. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2345-2352. <https://doi.org/10.1128/AEM.06260-11>
- Ospina-Betancourth, C., Acharya, K., Allen, B., Entwistle, J., Head, I. M., Sanabria, J., & Curtis, T. P. (2020). Enrichment of Nitrogen-Fixing Bacteria in a Nitrogen-Deficient Wastewater Treatment System. *Environmental Science & Technology*, 54(6), 3539-3548. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05322>
- Ospina-Betancourth, C., Acharya, K., Allen, B., Head, I. M., Sanabria, J., Curtis, T. P., & member, W. (2021). Valorization of pulp and paper industry wastewater using sludge enriched with nitrogen-fixing bacteria. *Water Environ Res*, 93, 1734-1747. <https://doi.org/10.1002/wer.1561>
- Pandey, N. (2020). Chapter 10—Exiguobacterium. En N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 169-183). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00010-1>
- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ren, K., Xu, M., Li, R., Zheng, L., Liu, S., Reis, S., Wang, H., Lu, C., Zhang, W., Gao, H., Duan, Y., & Gu, B. (2022). Optimizing nitrogen fertilizer use for more grain and less pollution. *Journal of Cleaner Production*, 360, 132180. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132180>

- Rennie, R. J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), 8-14.
<https://doi.org/10.1139/m81-002>
- Sansinenea, E. (2021). Chapter 14 - Application of biofertilizers: Current worldwide status. En A. Rakshit, V. S. Meena, M. Parihar, H. B. Singh, & A. K. Singh (Eds.), *Biofertilizers* (pp. 183-190). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00004-X>
- Sekoai, P. T., Ghimire, A., Ezeokoli, O. T., Rao, S., Ngan, W. Y., Habimana, O., Yao, Y., Yang, P., Yiu Fung, A. H., Yoro, K. O., Daramola, M. O., & Hung, C.-H. (2021). Valorization of volatile fatty acids from the dark fermentation waste Streams-A promising pathway for a biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 143, 110971.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110971>
- Sethi, S. K., & Adhikary, S. P. (2012). Cost effective pilot scale production of biofertilizer using Rhizobium and Azotobacter. *African Journal of Biotechnology*, 11(70), Article 70.
<https://doi.org/10.5897/AJBx11.012>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Christophe, G., Fontanille, P., & Larroche, C. (2013). Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, 145, 166-174.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.137>
- Smith, C., Hill, A. K., & Torrente-Murciano, L. (2020). Current and future role of Haber–Bosch ammonia in a carbon-free energy landscape. *Energy & Environmental Science*, 13(2), 331-344. <https://doi.org/10.1039/C9EE02873K>
- Son, J. E., Kim, H. J., & Ahn, T. I. (2020). Chapter 20—Hydroponic systems. En T. Kozai, G. Niu, & M. Takagaki (Eds.), *Plant Factory (Second Edition)* (pp. 273-283). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00020-0>

- Sowani, H., Kulkarni, M., & Zinjarde, S. (2018). An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* sp. species. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(4), 393-413. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1418286>
- Suthar, H., Hingurao, K., Vaghashiya, J., & Parmar, J. (2017). Fermentation: A Process for Biofertilizer Production. En D. G. Panpatte, Y. K. Jhala, R. V. Vyas, & H. N. Shelat (Eds.), *Microorganisms for Green Revolution: Volume 1: Microbes for Sustainable Crop Production* (pp. 229-252). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4_12
- Tobias-Hünefeldt, S. P., Wenley, J., Baltar, F., & Morales, S. E. (2021). Ecological drivers switch from bottom–up to top–down during model microbial community successions. *The ISME Journal*, 15(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00833-6>
- USDA. (2024). *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. <https://www.statista.com/statistics/263964/number-of-pigs-in-selected-countries/>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: From plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3-17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*, 10(1), 437-458. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>
- Wang, M., Khan, M. A., Mohsin, I., Wicks, J., Ip, A. H., Sumon, K. Z., Dinh, C.-T., Sargent, E. H., Gates, I. D., & Kibria, M. G. (2021). Can sustainable ammonia synthesis pathways compete with fossil-fuel based Haber–Bosch processes? *Energy & Environmental Science*, 14(5), 2535-2548. <https://doi.org/10.1039/D0EE03808C>
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C., & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *The ISME Journal*, 11(7), 1602-1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>

- Xi, L., Qiao, N., Zhang, Z., Yan, L., Li, F., Hu, J., & Li, J. (2017). *Sinorhodobacter hungdaonensis* sp. Nov. Isolated from activated sludge collected from a municipal wastewater treatment plant. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(1), 27-32. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0770-x>
- Xu, X., Wang, N., Lipson, D., Sinsabaugh, R., Schimel, J., He, L., Soudzilovskaia, N. A., & Tedersoo, L. (2020). Microbial macroecology: In search of mechanisms governing microbial biogeographic patterns. *Global Ecology and Biogeography*, 29(11), 1870-1886. <https://doi.org/10.1111/geb.13162>
- Young, W. L., Tran, S. H., & Moon-Soo, R. (2020). *Sinirhodobacter hankyongi* sp. Nov., a novel denitrifying bacterium isolated from sludge | *Microbiology Society*. 70(1). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003814>
- Yu, P., He, X., Baer, M., Beirinckx, S., Tian, T., Moya, Y. A. T., Zhang, X., Deichmann, M., Frey, F. P., Bresgen, V., Li, C., Razavi, B. S., Schaaf, G., von Wirén, N., Su, Z., Bucher, M., Tsuda, K., Goormachtig, S., Chen, X., & Hochholdinger, F. (2021). Plant flavones enrich rhizosphere Oxalobacteraceae to improve maize performance under nitrogen deprivation. *Nature Plants*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00897-y>
- Zhang, X., Zou, T., Lassaletta, L., Mueller, N. D., Tubiello, F. N., Lisk, M. D., Lu, C., Conant, R. T., Dorich, C. D., Gerber, J., Tian, H., Bruulsema, T., Maaz, T. M., Nishina, K., Bodirsky, B. L., Popp, A., Bouwman, L., Beusen, A., Chang, J., ... Davidson, E. A. (2021). Quantification of global and national nitrogen budgets for crop production. *Nature Food*, 2(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00318-5>
- Zhao, M., Zhao, J., Yuan, J., Hale, L., Wen, T., Huang, Q., Vivanco, J. M., Zhou, J., Kowalchuk, G. A., & Shen, Q. (2021). Root exudates drive soil-microbe-nutrient feedbacks in response to plant growth. *Plant, Cell & Environment*, 44(2), 613-628. <https://doi.org/10.1111/pce.13928>

Zuberer, D. A. (2021). 16 - Biological dinitrogen (N₂) fixation: Introduction and nonsymbiotic. En T. J. Gentry, J. J. Fuhrmann, & D. A. Zuberer (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology (Third Edition)* (pp. 423-453). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820202-9.00016-2>