

ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA AL PROCESO FÍSICOQUÍMICO DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO A PARTIR DE CONSORCIOS MICROBIANOS

Ing. MSc. Oscar Mauricio Rodríguez Arias

Directora: PhD. María Francisca Villegas Torres

Universidad del Valle
Sede Meléndez
Año 2023

CONTENIDO

RESUMEN	6
CAPÍTULO I: Introducción de disertación: El impacto antropogénico al ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	8
2.1. Objetivos de investigación	13
1.1.1 Objetivo general	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
1.2 El nitrógeno reactivo - Nr	14
1.2.1 Nitrógeno reactivo por fijación biológica de nitrógeno.....	18
1.2.2 Diazótrofos de vida libre	24
1.3 Otras fuentes naturales de nitrógeno reactivo	25
1.3.1 Rayos	25
1.3.1 Nitrógeno mineral	25
1.4 Fijación antropogénica de nitrógeno	26
1.4.1 Fijación biológica de nitrógeno en cultivos.....	26
1.4.2 Nitrógeno oxidado	28
1.4.3 Nitrógeno reducido.....	29
1.5 Consorcios microbianos, un nuevo enfoque a la producción de nitrógeno reactivo	33
1.5.1 Estructura y clasificación de los consorcios microbianos	34
1.5.2 Biotecnología de los cultivos mixtos.....	36
1.5.3 Actualidad de los consorcios microbianos fijadores de nitrógeno.....	37

1.6 Bibliografía.....	42
CAPÍTULO II ENRIQUECIMIENTO DE CONSORCIOS MICROBIANOS PROVENIENTES DE INÓCULOS NATIVOS EN BIOREACTORES	
2.1. Introducción.....	63
2.2. Metodología	64
Procedencia de inóculos	64
Aclimatación	65
Evaluación de grupos cultivables y pruebas bioquímicas.....	67
Extracción de ADN, secuenciación y análisis taxonómico.....	68
2.3. Resultados y discusión.....	68
Análisis de cultivabilidad de los inóculos	68
Cambios estructurales en la comunidad microbiana	70
2.3.3. Caracterización fisicoquímica de los reactores.....	74
2.4. Conclusiones.....	76
2.5. Bibliografía	77
CAPITULO III EVALUACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS FIJADORES DE NITRÓGENO EN CADENA DE VALORIZACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS... 80	
3.1 Introducción	80
3.2 Metodología	84
3.2.1 Selección de inóculos y sustratos.....	84
3.2.2 Caracterización fisicoquímica de inóculos y sustratos.....	85

3.2.3 Evaluación de fuentes de carbono por parte de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno - BFN	86
3.2.4 Evaluación del potencial de biometano - BMP	86
3.2.5 Diseño experimental	87
3.2.6 Análisis estadístico.....	88
3.3 Resultados y discusión	88
3.3.1 Caracterización fisicoquímica de inóculos y sustratos.....	88
3.3.2 Evaluación de fuentes de carbono por parte de BFN.....	92
3.3.3 Determinación del potencial de producción de biogás (BMP)	96
3.4 Conclusiones	105
3.5 Bibliografía.....	106
CAPITULO IV EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITRÓGENADA USANDO CONSORCIOS MICROBIANOS DE DIAZÓTROFOS.....	
4.1. Introducción.....	111
4.2. Materiales y métodos	113
4.2.1. Suelo y planta.....	113
4.2.2. Diseño experimental	114
4.2.3. Consorcio microbiano de diazótrofos - CMD.....	115
4.2.4. Plan de nutrición y fertilización.....	116
4.2.5. Análisis estadístico	116
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	116
4.3.1. Inóculo.....	116

4.3.2.	Experimento en campo	118
4.4.	Conclusiones.....	124
4.5.	Bibliografía	125
CAPITULO V CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJOS FUTUROS		131

RESUMEN

El presente trabajo doctoral aborda alternativa biotecnológica a la problemática asociada al proceso fisicoquímico de fijación de nitrógeno. Se desarrolló una estrategia de bioprospección en donde usando reactores en batch y a partir de inóculos provenientes de suelos y lodos de sistemas de tratamientos de aguas residuales, se establecieron ecosistemas microbianos capaces de crecer sin nitrógeno reactivo. Se determinó que, con la estrategia implementada independientemente del inóculo empleado, se puede establecer un consorcio microbiano fijador de nitrógeno logrando hasta duplicar la concentración de nitrógeno en el medio. Estas comunidades microbianas fueron posteriormente utilizadas en dos procesos biotecnológicos. En el primer caso, se acopló a la producción de metano en la valorización integral de residuos lignocelulósicos con una alta relación carbono nitrógeno C/N, en donde se pudo determinar que adicionando un 10% consorcio microbiano fijador de nitrógeno a un lodo anaerobio con respecto a su concentración de sólidos volátiles, se pudo aumentar hasta en un 57.5% la cantidad de biogas producido empleando bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) como sustrato. En el segundo caso, se utilizó un consorcio proveniente de suelo agrícola como sustituto a una fracción comprendida entre el 33% y 66% de la fertilización nitrogenada para la producción de ají cayena (*Capsicum annuum L.*). Se pudo determinar que al reemplazar en un 33% la fertilización nitrogenada por consorcios microbianos fijadores de nitrógeno se puede aumentar el peso y cantidad de frutos por planta. Los resultados obtenidos en esta investigación pueden ser aplicados en futuros estudios a un modelo integral de biorrefinería en el campo agroindustrial, en donde mediante el aprovechamiento de residuos orgánicos se produzcan biofertilizantes *in situ* y energía, disminuyendo la huella de carbono y nitrógeno de los procesos.

Palabras clave: Fijación de nitrógeno; Consorcios microbianos; Biogas; Biofertilizante; Bioreactores

ABSTRACT

This doctoral work addresses a biotechnological alternative to the problems associated with the physicochemical process of nitrogen fixation. A bioprospecting strategy was developed using batch reactors and inoculums from soils and sludge from wastewater treatment systems to establish microbial ecosystems capable of growing without reactive nitrogen. It was determined that, with the strategy implemented, regardless of the inoculum used, a nitrogen-fixing microbial consortium can be established, achieving an increase of the nitrogen concentration in the medium. These microbial communities were subsequently used in two biotechnological processes. In the first case, it was coupled to methane production in the integral valorization of lignocellulosic waste with a high C/N carbon-nitrogen ratio, where it was determined that by adding a 10% nitrogen-fixing microbial consortium to an anaerobic sludge with respect to its concentration of volatile solids, the amount of biogas produced using sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum*) as a substrate could be increased by 57.5%. In the second case, a consortium from agricultural soil was used as a substitute for a fraction between 33% and 66% of the nitrogen fertilization for the production of cayenne bell pepper (*Capsicum annuum* L.). It was determined that replacing 33% of nitrogen fertilization with nitrogen-fixing microbial consortia can increase the weight and quantity of fruits per plant. The results obtained in this research can be applied in future studies to an integral model of biorefinery in the agroindustrial field, where biofertilizers and energy can be produced in situ by using organic residues, reducing the carbon and nitrogen footprint of the processes.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN DE DISERTACIÓN: EL IMPACTO ANTROPOGÉNICO AL CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL NITRÓGENO

Desde finales del siglo XIX, las actividades antropogénicas han venido demandando más nitrógeno que la oferta biológica disponible (FAO, 2022). El ser humano, en la búsqueda de alternativas a esta necesidad, en un principio desarrolló estrategias para utilizar diferentes fuentes alternativas disponibles como el nitrógeno mineral o el estiércol animal, hasta que la oferta dadas por dichas alternativas no fue suficiente para suplir la demanda global de nitrógeno (FAO, 2018). No fue hasta que, a principios del siglo pasado, que se desarrolló una alternativa eficiente y capaz de suplir de manera constante y abundante los requerimientos de nitrógeno reactivo (N_r) para la humanidad. Se conoce como la reacción de Haber-Bosch (HB) (Wang et al., 2021). Este hito cambió por completo la historia de la humanidad, siendo considerado el invento más importante del Siglo XX, por encima de las telecomunicaciones (Liu, 2014; Smil, 2004).

El proceso Haber-Bosch sembró un nuevo paradigma y revolucionó por completo la ingeniería de procesos catalíticos, al punto de denominarse “El proceso que produce pan a partir del aire” (Witschi, 2000). Sin embargo, estos más de 100 años de uso de procesos catalíticos para la producción de nitrógeno han producido cambios considerables en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Lin et al., 2020). Adicionalmente, la emisión de gases producto de la combustión de hidrocarburos durante su producción y la descarga de efluentes nitrogenados a ecosistemas oligotróficos está haciendo cada vez más notorio el impacto ambiental de este proceso (Smith et al., 2020).

La alteración al ciclo del nitrógeno se suma al impacto que se viene dando a los demás ciclos naturales como el del carbono, fósforo o azufre. El fósforo es un nutriente no renovable y está limitado a los yacimientos de roca de fosfatos de algunos países (Elser & Bennett, 2011). La demanda y comercio global de este nutriente ha pasado de 11.2 TgP.año⁻¹ en el 1960 a 44.7 TgP.año⁻¹ en 2020 (FAO,

2022), teniendo un impacto cada vez más preocupante en ecosistemas naturales (Mardamootoo et al., 2021). Para el caso del azufre, sus emisiones durante la combustión de carbón acidifican lagos y ríos debido a la lixiviación de este compuesto en la lluvia ácida, además, generan smog altamente tóxico rico en dióxido de azufre como se observó durante “La Gran Niebla de Londres de 1952” (Zhang et al., 2014). Es bien conocido el caso del carbono, en donde emisiones atmosféricas en algunas de sus formas químicas tiene una incidencia en el cambio climático y el calentamiento global (Reay et al., 2018). Diversos modelos de predicción de cambio climático prevén un aumento de 1.5°C en la temperatura de la tierra para el 2030, una década antes de lo que se estimaba inicialmente (Xu et al., 2018).

Aunque los cambios al ciclo del nitrógeno generan impactos en todos los ecosistemas naturales y alteran otros ciclos, debido a la disponibilidad de la materia prima, la cual es el aire atmosférico, se considera que sus reservas son infinitas (Lin et al., 2020). Esto, a diferencia del Carbono como combustible o el Fósforo como nutriente, motivo por el cual la preocupación hacia el impacto en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno ha sido menos relevante. Es apenas que en los últimos 20 años se ha despertado un interés mayor en la búsqueda de alternativas a los procesos industriales de fijación de nitrógeno (Wang et al., 2021).

La deposición de nitrógeno en ecosistemas naturales es cada vez más preocupante, se estima que para el año 2050 el impacto llegue a 33 de los 34 ecosistemas “hot spots” del mundo, a niveles de hasta 15 kgNHa⁻¹yr⁻¹, comprometiendo el endemismo de especies vegetales, la alteración irreversible de estos ecosistemas y animales en la base de la cadena trófica como insectos (Ineson, 2006; Muchovej & Rechcigl, 2020; Stevens et al., 2018). Adicionalmente, las prácticas de manufactura en procesos industriales en todos los campos, ha desarrollado y así mismo depositado en el ambiente compuestos nitrogenados

que antes existían en muy bajas concentraciones como los nitrilos o compuestos completamente nuevos como los ésteres de nitrato, aminas aromáticas o amidinas (Gu et al., 2013).

La alteración al ciclo del nitrógeno va en una creciente preocupación y desde la última década se viene hablando por primera vez de una “huella de nitrógeno”, la cual estima la cantidad de nitrógeno depositado en términos de nitrógeno reactivo que se emite al agua, aire o suelo por unidad, de acuerdo a un alimento específico, por persona o una actividad humana (Fissore et al., 2011; Leach et al., 2012; L. Liang et al., 2019). Para el caso de la unión europea, se estima que con la producción de vegetales en promedio se emiten cerca de 500 gramos de nitrógeno por kilogramo de alimento producido (gN.Kg^{-1}), para carne de cerdo o aves de corral puede ser del orden de 100 gN.Kg^{-1} , mientras que para huevos y leche entre 30 y 50 gN.Kg^{-1} de producto (Leip et al., 2014). La huella anual de nitrógeno per cápita va del rango de los 7 Kg en países en vía de desarrollo como Papua Guinea y hasta los 100 Kg en países ricos como Luxemburgo, igualmente con Estados Unidos, Brasil, China e India, representando el 40% total de las emisiones per cápita de nitrógeno (Oita et al., 2016; Uwizeye et al., 2020).

La humanidad depende de los diferentes procesos antropogénicos de fijación de nitrógeno para la producción de alimentos y compuestos químicos. Sin embargo, es pertinente ahondar en alternativas que sustituyan paulatinamente estas técnicas de fijación y sean ambientalmente sostenibles (Cherkasov et al., 2015; Wang et al., 2021). Así mismo, se requieren procesos industriales y biotecnológicos más eficientes, que disminuyan el uso de nitrógeno en sus diferentes etapas o al menos lo recicle, dado que es bien conocido que no solamente el nitrógeno es empleado como fertilizante, sino que también se requiere en cientos de procesos industriales como la manufactura de bienes, medicamentos, pesticidas, explosivos, etc. (Huo et al., 2012; Razon, 2018).

La investigación de alternativas al proceso fisicoquímico de fijación de nitrógeno ha tenido varios enfoques. Inicialmente, se encuentra la búsqueda de mejoras a los procesos fisicoquímicos, desarrollando nuevos catalizadores, nuevas formas de síntesis, empleando menores presiones y temperaturas, optimizando procesos con mayor costo beneficio y adicionalmente un menor consumo de combustibles (Cheng et al., 2019; Forrest et al., 2021; Guo et al., 2019; Li et al., 2021; Li et al., 2020; Song et al., 2018). Posteriormente, se encuentra un enfoque hacia el proceso biológico de fijación de nitrógeno, mediante la investigación de los mecanismos enzimáticos que envuelven esta reacción y la posibilidad de replicarlos a mayor escala (Kyriakou et al., 2017; Milton & Minteer, 2019; Shipman & Symes, 2017), el estudio de nuevas cepas para el mejoramiento de los cultivos en campo (Favero et al., 2022; Jovino et al., 2022; Zhang et al., 2022), ingeniería genética para mejorar la fijación biológica (Jiang et al., 2021; Xiang et al., 2020), modificaciones genéticas en plantas con el fin de que estas puedan fijar nitrógeno (Good, 2018) y el reciclado de nitrógeno en bioprocesos (Gillingham et al., 2022; Motavaf et al., 2022; Mottakin et al., 2022).

Se ha centrado nuevamente la atención en la biología de la fijación de nitrógeno, debido a la evolución de las ciencias ómicas, incrementando la capacidad de analizar a profundidad ecosistemas microbianos completos y complejos a nivel taxonómico, metabólico, entre otros sin necesidad de emplear técnicas de cultivo (Prakash et al., 2023; Price et al., 2022; Sellami et al., 2022). En la actualidad, se estima que existen en la tierra entre 10^{11} y 10^{12} especies de microorganismos, se han podido cultivar y aislar, alrededor de 10^4 especies, menos de 10^5 se han clasificado por secuencia de su ADN y el Proyecto del Microbioma de la Tierra ha logrado catalogar cerca de 10^7 especies, de las cuales el 29% se ha detectado solo en 2 ocasiones (Locey & Lennon, 2016; Nayfach et al., 2020; Thompson et al., 2017). De acuerdo con estas cifras, el 99.999% de los microorganismos en la tierra no han sido descritos y clasificados. Adicionalmente, estas estimaciones no suman aquellos microorganismos dentro de la denominada “Materia oscura

microbiana”, en los cuales más allá de la definición de especies y taxones, se desconocen los linajes, anotaciones funcionales (Bernard et al., 2018).

En el mundo existen 17 países que albergan el 70% de la biodiversidad total, ocupando sólo el 10% del área del planeta, estos países son denominados países Megadiversos (Hu et al., 2021). De estos, tres países son industrializados (USA, Canadá y China), seis se consideran países de economías emergentes (Brasil, India, Malasia, México, Filipinas y Sudáfrica) y los ocho restantes son de economías en vía de desarrollo (Colombia, República democrática del Congo, Ecuador, Indonesia, Madagascar, Papúa y Nueva Guinea, Perú y Venezuela). Para el caso de Colombia, al ser un país en vía de desarrollo, ha tenido desconocimiento temprano en su biodiversidad, por factores como la falta de recursos en investigación y situaciones de conflicto interno que limitaron la exploración de esta en décadas pasadas. Por lo anterior, varios científicos han alertado acerca de la necesidad de proteger, mantener, identificar, explorar y clasificar más a fondo la biodiversidad en países no industrializados, ya que son los más ricos en biodiversidad (Paknia et al., 2015).

Colombia tiene en promedio entre 200 a 250 gramos de carbono de biomasa microbiana por metro cuadrado de suelo ($\text{gC}_{\text{mic.m}^{-2}}$), lo que equivale a un 4 a 5% del total del carbono del suelo, siendo de uno de los países con mayor índice de biomasa celular en sus suelos (Fierer, 2017; Serna-Chavez et al., 2013). Esta particularidad, es uno de los hechos que hacen plantear un desarrollo investigativo hacia la búsqueda, identificación y aprovechamiento de la biodiversidad microbiana colombiana en el ámbito de la biotecnología y sus ramas. En este caso puntual, se pone en contexto una problemática como lo es la deposición atmosférica y la huella de nitrógeno por el uso de compuestos nitrogenados y el interés actual en la búsqueda y desarrollo de alternativas a los procesos antropogénicos de fijación de nitrógeno.

La siguiente investigación doctoral, presenta una estrategia de bioprospección de inóculos provenientes de cuatro ecosistemas microbianos; dos naturales y dos antropogénicos; con el fin de producir y establecer comunidades microbianas alimentadas sin nitrógeno reactivo adicionado. Esto, produjo comunidades microbianas determinadas por los diversos tipos de asociaciones ecológicas con microorganismos fijadores de nitrógeno. Dos de estas comunidades microbianas establecidas fueron posteriormente evaluadas en dos procesos biotecnológicos. En el primer caso, se acopló uno de los inóculos microbianos fijador de nitrógeno a un modelo de producción de biogas, empleando como sustrato residuos lignocelulósicos con una alta relación carbono nitrógeno. Para el segundo caso, con el fin de reducir la utilización de fertilizantes nitrogenados, se evaluó el desempeño del segundo consorcio microbiano en un cultivo de ají (*Capsicum annuum* L. cv. Cayena) a escala real. Los resultados en conjunto, presentan una alternativa integral para abordar la problemática ambiental asociada a la alteración antropogénica del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

2.1. Objetivos de investigación

1.1.1 Objetivo general

- Investigar la factibilidad de una alternativa biotecnológica al proceso fisicoquímico de fijación de nitrógeno a partir de inóculos nativos de diferentes ecosistemas, evaluando sus potenciales usos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el potencial de desarrollo de consorcios microbianos fijadores de nitrógeno de cuatro diferentes inóculos nativos.
- Determinar la influencia de consorcios microbianos de fijación de nitrógeno en la digestión anaerobia para la producción de biogas a partir

de residuos lignocelulósicos de caña de azúcar *Saccharum officinarum* y palma africana de aceite (*Elaeis guineensis*).

- Evaluar la utilización de un consorcio microbiano fijador de nitrógeno como sustituto a la fuente de nitrógeno reactivo del plan de fertilización de un cultivo de ají cayena (*Capsicum annuum L.*) a escala real.

El siguiente capítulo, hace una descripción al contexto de la problemática, los antecedentes, la justificación y pertinencia de la investigación realizada.

1.2 El nitrógeno reactivo - Nr

El nitrógeno es el quinto elemento más abundante del sistema solar y es uno de los pilares que construyen la vida. Es un componente esencial del ADN, del ARN, y de las proteínas, por cada 100 átomos de carbono que se incorporan a una célula, entre 2 y 20 átomos de nitrógeno también son incorporados (Canfield et al., 2010). A pesar de que la mayoría de la composición de la atmósfera es nitrógeno (N₂), este compuesto en la atmósfera no está en una forma asimilable para la mayoría de los organismos vivos, debido al fuerte enlace triple entre sus átomos y a que es un gas relativamente inerte (Stevens, 2019).

La masa total atmosférica está compuesta en un 78% por nitrógeno molecular o dinitrógeno (N₂) y es una reserva cercana a las 3.9 x 10⁹ Ton (Stevens, 2019). De estas reservas se emplean alrededor del 0.1% entre procesos naturales y antropogénicos, lo cual, debido a su alta disponibilidad y constante regeneración, se considera un recurso infinito incorporado (Canfield et al., 2010). El nitrógeno fue descubierto a finales del siglo XVIII por diferentes investigaciones en paralelo llevadas por Priestley, Scheele y Daniel Rutherford, sin embargo, este último fue el que lo aisló del aire con la quema del oxígeno y posterior remoción del CO₂ (Weeks, 1933).

Para 1787, Berthollet propuso que el amonio (Azano o espíritu de Hartshor, como se conocía en la antigüedad) consistía en nitrógeno elemental e hidrógeno, lo que desencadenó en investigaciones para producir la síntesis de amonio a partir de hidrógeno y nitrógeno. Sin embargo, la primera dificultad en orden de poder producir amonio de manera artificial fue el equilibrio químico, dado que las concentraciones de amonio eran desconocidas y se desconocían las leyes de acción de masas y de equilibrio químico, las cuales apenas se determinaron a finales del siglo XIX (Liu, 2014).

Originalmente, el nitrógeno reactivo disponible es suministrado de manera natural. Las reservas existentes de nitrógeno atmosférico sólo pueden ser asimilables y utilizadas por los seres vivos cuando la molécula de N_2 es convertida a uno de sus ocho estados de oxidación restantes, conocidos como formas reactivas de nitrógeno (N_r) (Figura 1.1).

Para los organismos vivos, el papel que desempeña el nitrógeno en su metabolismo se puede agrupar en dos categorías generales. La asimilación, es decir, la adquisición de la materia para la incorporación a la biomasa, y desasimilación, que designa a los procesos que están asociados con la extracción de energía desde el medio ambiente (Rai, 2019). Los compuestos nitrogenados pueden servir ya sea como oxidantes o reductores. Estas transformaciones son en gran medida llevada a cabo por grupos especializados de procariotas, sin embargo, algunos eucariotas también contribuyen de manera asociativa en este proceso (Myrold, 2021).

Molécula	Nombre	Estados de Oxidación	
C-NH ₂	Nitrógeno Orgánico		Reducido
NH ₃ , NH ₄ ⁺	Amoniaco, Amonio	-3	
N ₂ H ₄	Hidrazina	-2	
NH ₂ OH	Hidroxilamina	-1	
N ₂	Dinitrogeno	0	
N ₂ O	Óxido Nitroso	+1	
NO	Óxido Nítrico	+2	
HNO ₂ , NO ₂ ⁻	Ácido Nitroso, Nitrito	+3	
NO ₂	Dióxido de Nitrógeno	+4	
HNO ₃ , NO ₃ ⁻	Ácido Nítrico, Nitrato	+5	
			Oxidado

Figura 1.1 Formas reactivas y estados de oxidación del nitrógeno. Fuente: elaboración propia

En una escala global, la disponibilidad de nitrógeno es controlada por el equilibrio entre la fijación de nitrógeno y el reciclaje de nitrógeno, proceso comúnmente llamado ciclo del nitrógeno (Stevens, 2019). Este, es impulsado por una combinación de transformaciones biológicas de asimilación y desasimilación. También se incluyen transformaciones abióticas como la fijación de nitrógeno por los rayos y descargas eléctricas, o el flujo de nitrógeno a través de la corteza terrestre, que se dan en menor cantidad que las transformaciones bióticas, que son todas las fijaciones que realizan organismos vivos (Myrold, 2021; Stevens, 2019).

La figura 1.2 esquematiza el ciclo biológico del nitrógeno. Las transformaciones metabólicas se muestran con flechas gruesas e igualmente se representan los procesos clásicos de asimilación (verde) y desasimilación (gris) del nitrógeno. Los procesos recientemente descubiertos se muestran en los demás colores. Los procesos aeróbicos y anaeróbicos se separan, y trazos flechas verticales indican intercambio o transporte entre entornos óxicos y anóxicos, el sentido de las flechas indica la dirección del transporte.

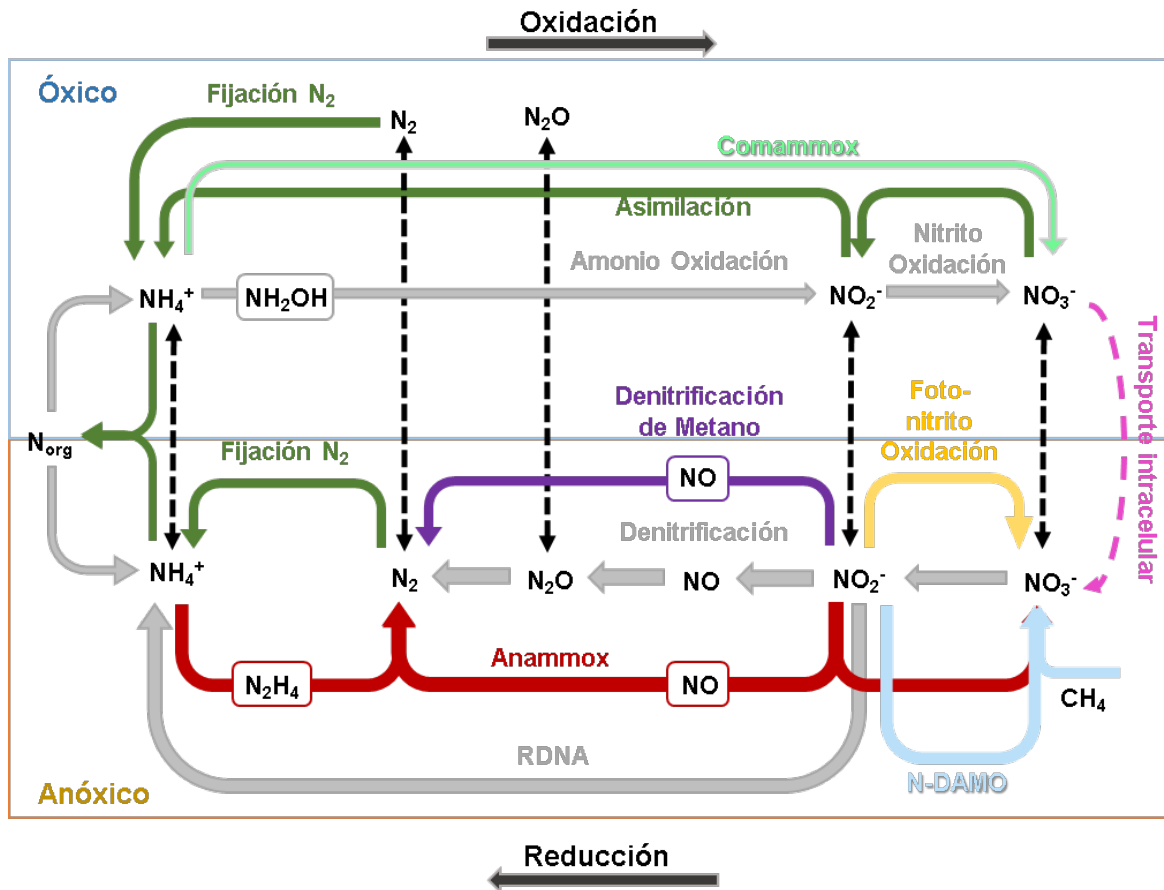


Figura 1.2 Ciclo biológico del nitrógeno (Pappu et al. 2017; Thamdrup 2012).

Los procesos microbianos dados en el ciclo del nitrógeno los acopla estrechamente con el ciclo del carbono. Hasta hace algunas décadas, los dos únicos procesos conocidos de transformación microbiana desasimilatoria se conocían como nitrificación y desnitrificación. La nitrificación es un proceso de oxidación aeróbica de amonio a nitrito y luego a un nitrato realizado por un grupo especializado de procariotas para cada vía, mientras que la desnitrificación es el proceso de reducción anaeróbica respiratoria del nitrato a través de nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso a gas dinitrógeno (Isobe & Ohte, 2014). El proceso se combina con la oxidación de materia orgánica, hidrógeno u otros donantes de electrones, como las especies de hierro o azufre. Los procariotas involucrados en el proceso de nitrificación utilizan electrones de la oxidación de amonio y nitrito para reducir el CO_2 generando biomasa (Pappu et al., 2017). El ciclo de nitrógeno

abarca una variedad de reacciones descritas en una gran cantidad de ecosistemas naturales, las cuales han tenido un desarrollo e identificación a un mayor nivel desde la última década con la diversificación de las ciencias ómicas y el estudio genético de ecosistemas naturales. Avances en la determinación de nuevos metabolismos como la nitrito oxidación fototrófica, oxidación de amonio por arqueas como crenarchaea, el proceso anammox, la denitrificación de metano, las bacterias oxidadoras completas de amonio o en el caso del proceso de fijación de nitrógeno, arqueas metanogénicas y fijadoras de nitrógeno a altas temperaturas, hacen parte de los avances desarrollados en este ciclo natural (Daims et al., 2015; Jetten, 2008; Mehta & Baross, 2006; Wanrosli et al., 2007).

1.2.1 Nitrógeno reactivo por fijación biológica de nitrógeno

Se le denomina diazótrofos a todo organismo capaz de fijar nitrógeno gaseoso (N_2) y se limita a grupos taxonómicos del dominio Eubacteria y Archea, de los cuales tres grupos han sido descritos hasta el momento: Diazótrofos de vida libre, asociativos y simbióticos (Newton, 2006). La fijación de nitrógeno es catalizada por un complejo enzimático llamado nitrogenasa (González-Andrés & James, 2016a). En general, la nitrogenasa consta de dos proteínas, dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. Ambas proteínas contienen hierro, y la dinitrogenasa adicionalmente molibdeno (Einsle & Rees, 2020). El hierro y el molibdeno en la dinitrogenasa son parte del cofactor de la enzima llamado cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co), y en este sitio se produce una reducción de N_2 . La composición de FeMo-co es $MoFe_7S_8 \cdot \text{homocitrato}$. La familia de las nitrogenasas consta de tres formas homólogas denominadas según el contenido metálico diferencial del cofactor del sitio activo: Mo-nitrogenasa (Nif, codificada por *nif*), V-nitrogenasa (Vnf, codificada por *vnf*), y Fe-nitrogenasa (Ver Figura 1.3) (García et al, 2020; Mus et al., 2019b).

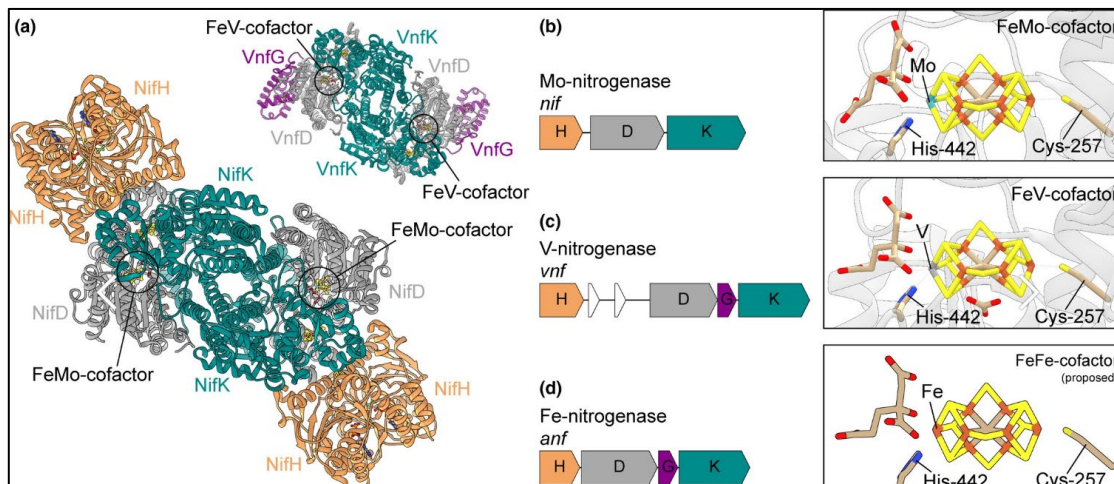
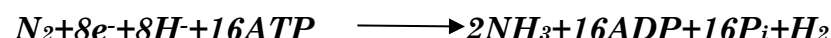


Figura 1.3 Estructura y genética de las tres formas de nitrogenasa (García et al, 2020)

La reductasa dinitrogenasa utiliza ATP como fuente de energía (alrededor de 150 kcal/mol) para transferir electrones excitados a la enzima dinitrogenasa (Einsle & Rees, 2020). Debido a la diversidad de organismos fijadores de nitrógeno, igualmente existe una variedad en la obtención de la energía necesaria para romper el triple enlace de la molécula de N_2 (Kaschuk & Hungria, 2017). Dicha energía puede obtenerse de diferentes fuentes: a través de la conversión de la energía lumínica para el caso de las cianobacterias (organismos fotoautótrofos), o a través de la respiración de los heterótrofos como *Azotobacter* (Bitton, 2002). La efectividad de la enzima nitrogenasa puede perderse por presencia de oxígeno molecular (O_2) al momento de la reacción, debido a esto muchos diazótrofos fijan nitrógeno anaeróbicamente o microaeróbicamente, en algunas cianobacterias el proceso se realiza en estructuras de resistencia como los heterocistes (Ver tabla 1.1) (Cooper & Scherer, 2011). Adicionalmente, en presencia de amonio libre, la fijación de nitrógeno se suspende. Esto, debido a un mecanismo denominado switch-off, en el cual las bacterias dejan de fijar nitrógeno y producir nitrogenasa como ahorro a la demanda energética de producir dicha enzima cuando existe una alternativa de amonio en el ambiente (Kessler et al., 2001).

Durante el proceso de fijación biológica de nitrógeno molecular, el triple enlace de la molécula de N₂ se reduce sucesivamente en la superficie del cofactor FeMoCo, produciendo dos moléculas de amoníaco como primer producto detectable (Einsle & Rees, 2020). La nitrogenasa reduce nitrógeno y el hidrógeno simultáneamente, usando 75% del flujo de electrones en la reducción del nitrógeno y 25% en hidrógeno (Rutledge & Tezcan, 2020). La estequiometría total de estas reacciones es:



Los diferentes mecanismos para mantener la nitrogenasa funcional son la alta tasa respiratoria y la compartimentación o la protección conformacional, los cuales les permite a las bacterias mantener bajas concentraciones de oxígeno en el entorno citoplasmático (Jasniewski et al., 2020).

Tabla 1.1 Mecanismos de protección por parte de los FBN a la destrucción de la enzima nitrogenasa por exposición al oxígeno (Adaptado de (Bitton 2002))

Mecanismo	Descripción
Evitación	Organismos anaerobios y anaerobios facultativos fijan N ₂ sólo en ausencia de O ₂ , con la excepción de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , que puede tolerar niveles muy bajos de O ₂ . De hecho, el O ₂ es uno de los factores que regulan la síntesis de la nitrogenasa en esta bacteria.
Microaerofilia	La mayoría de las bacterias aerobias diazotróficas fijan el nitrógeno a bajas presiones parciales de O ₂ , disminuyendo así la exposición de la nitrogenasa a este. Por ejemplo, (Okon et al. 1977) hallaron que la <i>Spirillum lipoferum</i> fija N ₂ más rápidamente a 0,007 atm O ₂ .
Protección respiratoria o respiración activa	Es una estrategia empleada por todos los aerobios para desviar el oxígeno molecular de la enzima. En ciertas especies de <i>Azotobacter</i> , se presenta una forma exagerada de protección a esta enzima, ya que esta bacteria presenta una de las tasas más altas de respiración

	de todas las formas de vida. La alta tasa de respiración barre con todo el O ₂ y lo mantiene alejado de la nitrogenasa. Como consecuencia de ello, la bacteria debe consumir grandes cantidades de sustrato para “secuestrar” el O ₂ , teniendo un crecimiento muy ineficiente en términos del carbono consumido en estas condiciones.
Protección conformacional	Este mecanismo presentado en algunas especies de <i>Azotobacter</i> , se desencadena cuando la protección respiratoria está saturada o cuando no existe suficiente fuente de carbono disponible. La nitrogenasa se une a otras proteínas que protegen sus sitios activos mientras hay intensa oxigenación. De esta manera la nitrogenasa no puede actuar, pero cuando la condición de exceso de oxigenación pasa, queda liberada restableciéndose su capacidad de fijación y sin destruir la enzima.
Producción de células especializadas	Muchas cianobacterias diazotróficas poseen particularidades en su morfología celular para la protección de la enzima nitrogenasa. Estas células poseen paredes más gruesas llamadas heterocistos, en el que se compartimenta la nitrogenasa para su protección. Estas células no generan O ₂ en la fotosíntesis y la pared gruesa excluye el O ₂ externo. El actinomiceto diazotrófico, <i>Frankia</i> , produce vesículas en la que nitrogenasa está protegido de O ₂ . La pared de la vesícula se vuelve más gruesa a medida que aumenta la concentración de O ₂ en el medio.
Producción de Exopolosacáridos	En <i>Derxia gumosa</i> , <i>Azotobacter sp</i> y <i>Beijerinckia sp</i> , se presenta una forma de protección relacionada a la presencia de exopolisacáridos. En <i>Derxia gumosa</i> , por ejemplo, la forma de sus colonias, que son redondeadas presenta abundante cantidad de polisacáridos extracelulares (alginatos), generando una especie de goma o baba protectora. La presencia de este compuesto hace que en el interior de la colonia exista una disminución de la concentración de O ₂ que permite que la nitrogenasa actúe de manera más eficiente.

La distribución filogenética de la fijación de nitrógeno (Figura 1.4, Círculos verdes) es amplia pero irregular, lo que indica múltiples adquisiciones y pérdidas evolutivas. La transferencia horizontal de los genes de fijación de nitrógeno aparentemente ha sido generalizada en diversos filos bacterianos y algunas arqueas, pero los eucariotas han adquirido esta capacidad exclusivamente mediante simbiosis con bacterias (denominado como fijación simbiótica de nitrógeno), ninguna de las cuales ha evolucionado en orgánulos (Mus et al., 2019a; Schaechter, 2010). El dendrograma muestra las relaciones entre los filos microbianos como se infiere por el análisis de las secuencias del gen 16S del ARN ribosomal. Las ramas azules se usan para denotar los filos de Bacterias y de ramas rojas para Archaea. Los círculos de colores indican los filos que contienen al menos una especie con un rasgo funcional indicado en la clave de color.

Aunque los organismos fijadores de nitrógeno son ubicuos, la cantidad potencial de nitrógeno fijado por estas bacterias depende en gran medida del ecosistema en el que los organismos son activos y así mismo en la disponibilidad de nitrógeno reactivo. Al ser un proceso metabólico de alta demanda energética, los microorganismos regulan rigurosamente su producción y actividad enzimática asociada a la fijación de nitrógeno (Masepohl, 2015; Smercina et al., 2019). Se destacan organismos anaerobios, microaerobios, aerobios, así como también organismos con capacidad fotosintética y metanogénica entre otros (Estrada, 2008). Estos FBN han sido encontrados en suelos bajo diferentes usos (Poly et al., 2001a; Poly et al., 2001b; Rosado et al., 1998), entornos marinos y salobres (Zehr & Capone, 2021), lagos y reservorios de agua dulce (Flores, 2005; Wenz et al., 2019) y ecosistemas diseñados por el hombre como sistemas para tratamiento de aguas dentro de los que se encuentran humedales artificiales, lodos activados y sistemas naturales de lagunaje para el tratamiento de aguas residuales (Gauthier et al., 2000; Ospina-Betancourth et al., 2021a; Ospina-Betancourth et al., 2021b; Rodriguez-Gonzalez et al., 2021; Sanz & Köchling, 2007; Velázquez, 2005).

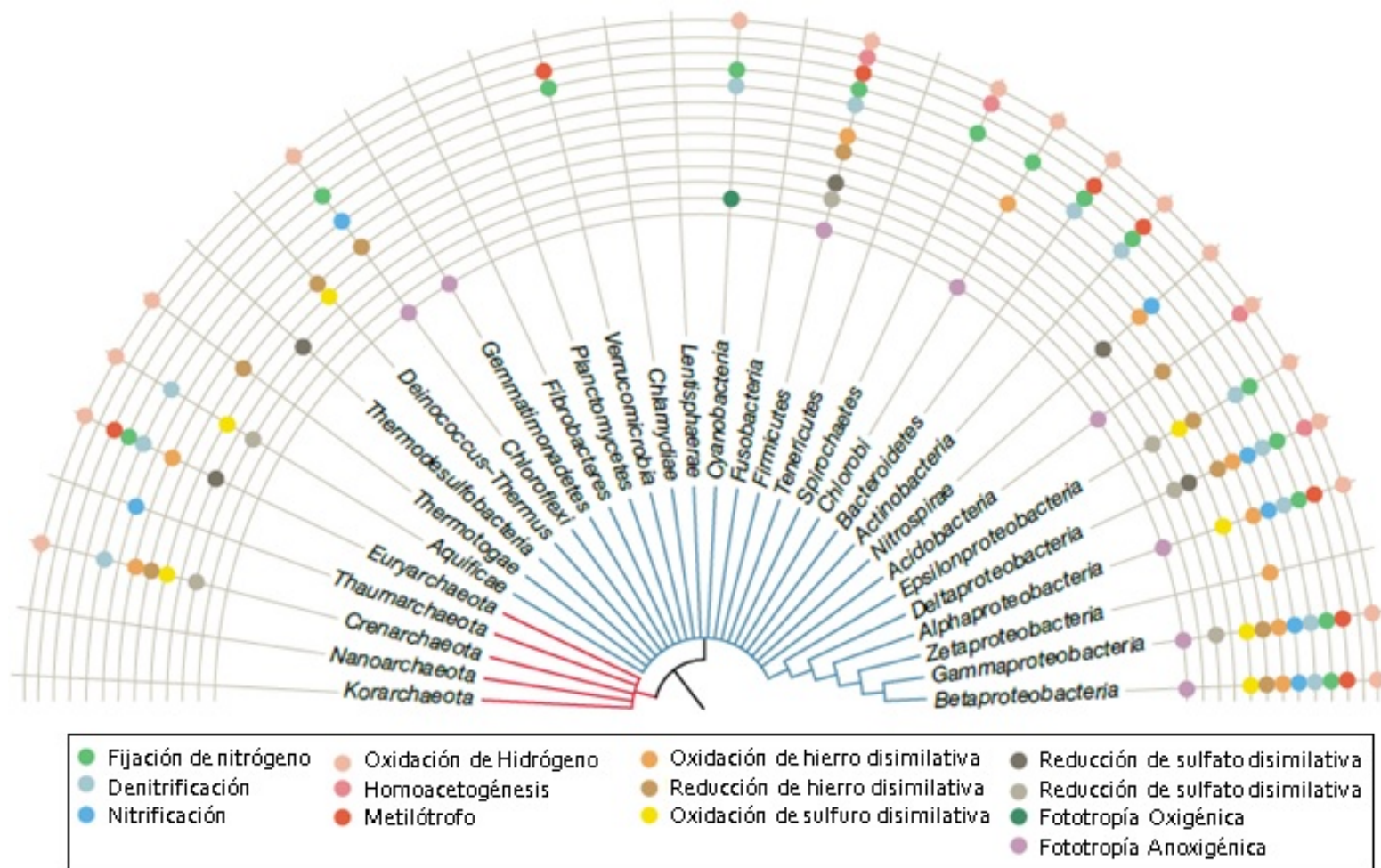


Figura 1.4 Principales rasgos funcionales mapeados a través de los principales filos de Bacteria y Archaea.

1.2.2 Diazótrofos de vida libre

Los diazótrofos en su mayor cantidad, son de vida libre o asimbióticos, es decir, pueden realizar el proceso de fijación de nitrógeno sin la simbiosis con plantas o sin ninguna asociación metabólica con otros seres vivos (Madigan et al., 2019). Fueron descritos por primera vez por Winogradsky en 1893 (*Clostridium pasteurianum*) y Beijerinck en 1901 (*Azotobacter*) (Noar & Bruno-Barcena, 2018). El descubrimiento de nuevos diazótrofos de vida libre ha venido estando asociado al desarrollo de la técnica del isótopo estable *nitrógeno 15* y la técnica de reducción de acetileno para la detección de la enzima reductasa (Halbleib & Ludden, 2000; Vincent et al., 2017). Entre las bacterias de vida libre pueden encontrarse: anaeróbicas obligadas o facultativas (e.j. *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.), aeróbicas obligadas (e.j. *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp.) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, y bacterias verdes sulfurosas) (Kavadia et al., 2008). Las bacterias aeróbicas dependen fuertemente de las condiciones de humedad, oxígeno y materia orgánica, y las anaeróbicas son predominantes en suelos anegados donde existen las condiciones de humedad y materia orgánica, pero el suministro de oxígeno está restringido (Madigan et al., 2019).

La fijación biológica de nitrógeno en los suelos tropicales con las condiciones requeridas de humedad, temperatura y materia orgánica es generalmente alta. Se reporta que el número de bacterias fijadoras de nitrógeno es particularmente elevado en la zona adyacente a la raíz (rizosfera), debido a la liberación de compuestos orgánicos que le sirven como fuente de carbono (Smercina et al., 2019). En general, los diazótrofos obtienen su carbono y los suministros de energía a partir de exudados de la raíz y los lisados, residuos de células vegetales y los residuos orgánicos en el suelo y el agua. Se pueden encontrar en el suelo "completamente de vida libre" o en asociaciones, como resultado de la colonización de raíz o rizosfera de la planta (Smercina et al., 2019).

1.3 Otras fuentes naturales de nitrógeno reactivo

1.3.1 Rayos

Previo al desarrollo de los procesos de fijación fisicoquímica de nitrógeno, la humanidad dependía netamente de las fuentes naturales de este mineral. Durante una tormenta eléctrica, la energía y temperatura de los rayos pueden alcanzar los 10.000 millones de Julios y casi 30,000 °C respectivamente, propiciando las condiciones de rompimiento del triple enlace del N_2 y produciendo de manera natural NO_x . Esta formación de nitrógeno se plantea como una de las primeras fuentes de nitrógeno que propició la vida en la tierra, eones atrás (Stüeken et al., 2016). Dado la complejidad de la predicción de la cantidad de rayos en la tierra y la energía descargada durante una tormenta, es complejo determinar la cantidad de nitrógeno fijado por este proceso natural. Diferentes modelos satelitales como Cirrus Regional Study of Tropical Anvils and Cirrus Layers—Florida Area Cirrus Experiment (CRYSTAL-FACE), European Lightning Nitrogen Oxides Project (EULINOX), Stratosphere Troposphere Experiment: Radiation, Aerosols and Ozone (STERAO), y Preliminary Regional Experiment for STORM (PRE-STORM) predicen la cantidad de rayos y el potencial NO_x fijado, llegando a valores 6.3 Tg N año⁻¹ en los trópicos y entre 0.09 y 0.2 Tg N año⁻¹ en Europa (Arndt et al., 2019; Bond et al., 2002). Se estima que en promedio se fijan máximo 10 Tg N año⁻¹ a nivel mundial, esto dependiendo de las condiciones climatológicas en todas las regiones a nivel mundial (Fowler et al., 2013).

1.3.1 Nitrógeno mineral

Aunque los fósiles sitúan el comienzo de la vida hace 3800 millones de años, la tierra ha venido acumulando material orgánico nitrogenado desde hace cerca de 4100 millones de años, quimiofósiles de isotopos de carbono en zircones de las colinas de Jack Australia evidencian la actividad biológica mucho antes de los

primeros fósiles registrados (Bell et al., 2015; Stüeken et al., 2016). El manto y la corteza terrestre aportan un contenido de nitrógeno estimado en aproximadamente un 26% del total de todas las fuentes naturales previas a la revolución industrial, es decir, sin contar la combustión o procesos fisicoquímicos. Se estima que anualmente son movilizados desde el manto y la corteza a la superficie terrestre, entre 19 y 31 Ton de N_2 , de los cuales se movilizan por erosión entre 11 a 18 Ton de N_2 ·año⁻¹ (Houlton & Dahlgren, 2018).

Otras fuentes de nitrógeno mineral han sido el Guano, el cual ha sido recolectado mayoritariamente en islas en frente de la costa pacífica sudamericana (Hatfield & Follett, 2008). Así mismo, yacimientos de nitrato de sodio de minas de Chile, Perú y Bolivia que han sido explotados de manera extensiva. Para comienzos del siglo XX, Chile era el principal comercializador de fertilizantes nitrogenados del mundo, aportando dos tercios del total de la producción mundial (Watt, 2003).

1.4 Fijación antropogénica de nitrógeno

Adicional a los procesos industriales, la disponibilidad de N_r es generalmente aumentada de una manera inducida por el hombre, mediante la inoculación de microorganismos fijadores de nitrógeno en la actividad agrícola.

1.4.1 Fijación biológica de nitrógeno en cultivos

La producción global de alimentos fija entre 50 a 70 Tg N año⁻¹ y está dada por las asociaciones de algunos cultivos productivos y microorganismos muy específicos (Herridge et al., 2008). Se relaciona las mayores tasas de fijación a la asociación de leguminosas con bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, en menor cantidad se debe a la fijación que se realiza por asociaciones entre algunas angiospermas y bacterias del género *Frankia*, en una asociación denominada plantas *actinorricicas* y *Rhizobios* con una planta no leguminosa del género *Parasponia* (González-Andrés & James, 2016b; Jean et al., 2013).

Principalmente, existen dos tipos de fijación biológica de nitrógeno en cultivos propiciada por el hombre (Figura 1.5), primero está la producción en cultivo de alimentos, en donde principalmente una diversidad de leguminosas es cultivada para el consumo humano, dependiendo el país o región, entre los que se encuentran cultivos de soya, maní, lentejas, arvejas, guisantes, habas, fríjoles, judías, cacahuates, garbanzos, entre otros. El segundo caso es donde se cultivan pastos y forrajes para la alimentación de animales para consumo humano.

Igualmente, asociado al ciclo del nitrógeno, existen otras transformaciones fisicoquímicas que transforman este compuesto en formas asimilables. En suelos bajo condiciones anegadas o en cultivos con excesos de humedad a causa del riego, pueden presentarse condiciones anóxicas en donde la denitrificación se puede llevar a cabo. Adicionalmente, existen evidencias de que hay emisiones de óxido nitroso (N_2O) en niveles cada vez más alto, ya que este gas causante del efecto invernadero tiene 300 veces (por molécula) el potencial de calentamiento del CO_2 , además de su reactividad con el ozono y la consecuente destrucción de la capa de ozono (Ravishankara et al., 2009). Las emisiones de óxido nitroso a la atmosfera por actividades agrícolas representan la cuarta parte del total de las emisiones de este compuesto generadas en el planeta (Skinner et al., 2014).

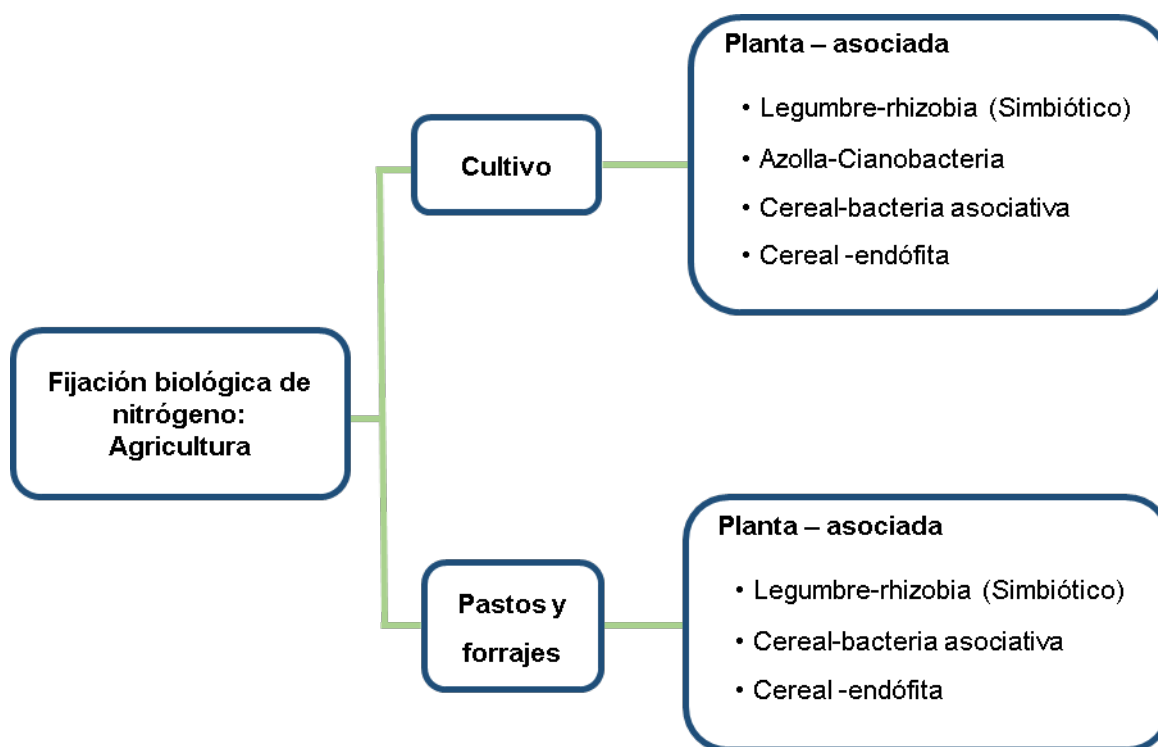


Figura 1.5 Distribución de la fijación biológica de nitrógeno en agricultura y el tipo de asociación planta-microorganismo que se establece

1.4.2 Nitrógeno oxidado

A lo largo de los siglos, las capas de lodo y residuos biológicos fueron sometidos a altas presiones y temperaturas, formando rocas saturadas de petróleo crudo. Se ha sugerido que la forma dominante de materia orgánica responsable de la formación de petróleo y la síntesis de petróleo crudo se deriva de organismos fotosintéticos microscópicos. Estos, junto con la vegetación terrestre lavada en los sedimentos marinos de lagos y costas, que se acumuló durante millones de años (Tissot & Welte, 1984).

Recursos naturales como los hidrocarburos, carbón o biomasa, son empleados como fuente de energía en la combustión de motores o plantas industriales, aunque la composición varía, estos combustibles pueden alcanzar una composición elemental de N_2 de hasta el 2% y tener, como en el caso del petróleo

crudo, más de 3000 compuestos aromáticos nitrogenados diferentes (Qian et al., 2001). Independientemente del proceso de combustión, se emiten concentraciones de óxidos de nitrógeno ($\text{NO}_x = \text{NO} + \text{NO}_2$) o amoníaco (NH_3). Ambas formas son reactivas en la atmósfera inferior y se depositan sobre cualquier ecosistema, en proporciones mayores a menor distancia de la fuente productora. El NO_x emitido se puede depositar en una variedad de formas, denominadas colectivamente $\text{NO}_Y \{ = \text{NO}_x + \text{HNO}_2 + \text{HNO}_3 + \text{HO}_2\text{NO}_2 + \text{NO}_3 + 2\text{N}_2\text{O}_5 + \text{PAN (peroxiacetil nitrato)} + \text{nitratos particulados}\}$; la deposición total de amonio es como $\text{NH}_x = (\text{NH}_4 + \text{NH}_3 + \text{NH}_4\text{HSO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ (Townsend et al., 1996). La combustión vehicular y las emisiones de la industria depositan a nivel global alrededor de 30 Tg N.año⁻¹, mientras la quema de biomasa 4 Tg N.año⁻¹ (Fowler et al., 2013).

1.4.3 Nitrógeno reducido

En el año de 1898, el químico Británico Sir William Crookes anunció que las reservas de nitrógeno en el mundo estaban en descenso y que en no más de 40 años la población mundial empezaría a sufrir de hambruna si no se buscaban nuevas fuentes de nitrógeno (Smil, 2004). Por décadas, múltiples investigaciones se habían llevado a cabo, demostrando la necesidad de los fertilizantes para incrementar la productividad de los cultivos a nivel mundial, sin embargo, no existían herramientas a escala industrial que fueran capaces de suplir los fertilizantes convencionales de la época, los cuales sus yacimientos eran limitados (Galloway, 2017).

Para comienzos del siglo XX, Chile era el principal comercializador de fertilizantes nitrogenados del mundo, aportando dos tercios del total de la producción mundial. El tercio restante del nitrógeno fertilizante demandado, era suplido por subproductos de soluciones amoniacaes y por el sulfato de amonio producto de la combustión de diferentes tipos de carbón (Wisniak & Garcés,

2001). En 1909, se dio el punto de quiebre ante la problemática de una nueva alternativa de N_r , por el desarrollo de la síntesis catalítica de amonio realizada por el químico Fritz Haber en Karlsruhe Alemania, lo que lo llevaría a obtener por este trabajo el premio nobel de química en 1918. Ya para en el año de 1913, la compañía Alemana BASF a la cabeza del Químico e Ingeniero Carl Bosch, industrializó y estandarizó la técnica de fijación de nitrógeno vía síntesis de amoniaco, lo que le significó el premio nobel de química de 1931.

Hoy en día, la agricultura moderna está basada en el uso de fertilizantes químicos y a su vez, la producción de fertilizantes nitrogenados a partir del proceso Haber-Bosch. En los más de 200 años de investigación y desarrollo en el nitrógeno reactivo (Ver figura 2) y especialmente en la optimización del proceso Haber-Bosch, se sigue demandando un alto consumo energético debido a la temperatura y presión requerida para desestabilizar el triple enlace que une la molécula de N_2 . La energía empleada se toma del gas natural, que también se emplea como fuente de hidrógeno en la reacción, lo que demanda alrededor del 5% de todo el gas natural extraído por la humanidad, equivalente al 1% del suministro energético global (Coskun et al., 2016; Fisher & Newton, 2002).

El cambio al ciclo natural del nitrógeno a causa de actividades antropogénicas, ha generado un impacto considerable en el medio ambiente (Ver figura 1.6). Tan solo entre las décadas de los 60's y los 90's la fertilización nitrogenada tuvo un incremento cercano al 800% (Fixen & West, 2002). Anualmente, la humanidad fija 210 millones de toneladas de nitrógeno, mientras que el ciclo natural fija 203 TgN.año⁻¹, de este valor fijado de manera artificial, un 80% se destina para la producción de alimentos para animales y fertilizantes (Fowler et al., 2013; Ladha et al., 2016). En el año 2014, investigadores de todo el mundo firmaron la “Declaración de Nanjing para la disminución del consumo de nitrógeno reactivo”, la cual estableció una agenda para la protección de sistemas agrícolas, estuarios y ecosistemas (Erisman, 2004). Sin embargo, las predicciones del consumo de N_r

bajo diferentes escenarios pronostican un aumento en la demanda de estos compuestos. Para el 2050, si basáramos nuestra alimentación en una guía nutricional sana y balanceada, tendríamos una demanda de 170 millones de $\text{N}_2\cdot\text{año}^{-1}$. Mientras que, si se continúa con la dieta y consumo actual de alimentos, se demandarían 230 millones de toneladas de $\text{N}_2\cdot\text{año}^{-1}$. Tan solo aumentar un 2% anual el consumo de proteína animal, requeriría hasta 320 millones de $\text{N}_2\cdot\text{año}^{-1}$ (Galloway et al., 2017).

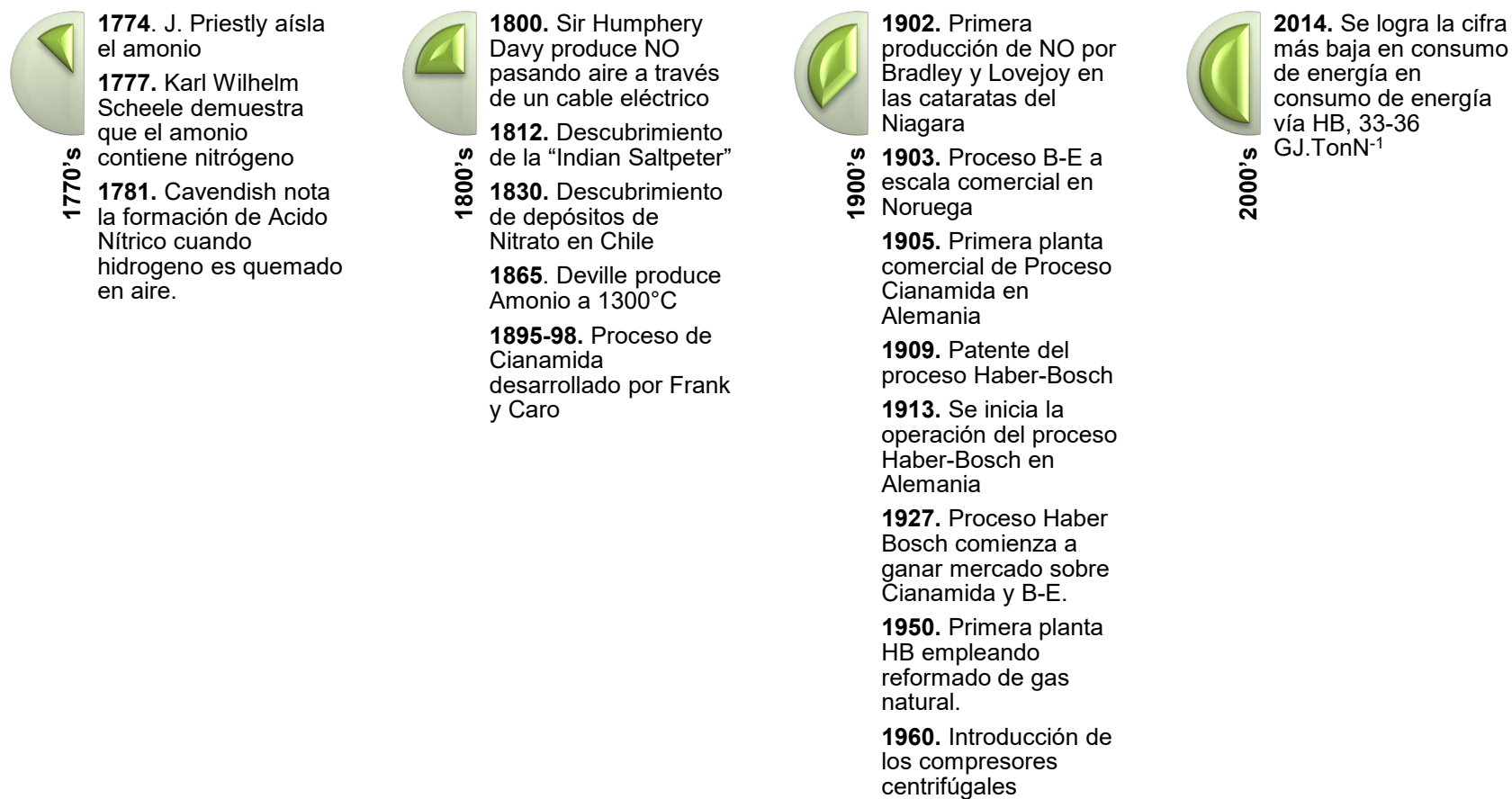


Figura 1.6 Línea de tiempo investigaciones en fijación de nitrógeno

1.5 Consorcios microbianos, un nuevo enfoque a la producción de nitrógeno reactivo

En un consorcio microbiano, los microorganismos excretan una variedad de metabolitos y apoyan el crecimiento de otros microorganismos en una comunidad (Bhatia et al., 2018; Duncker et al., 2021). De acuerdo con la ley del equilibrio químico, el consumo de metabolitos excretados por los microbios receptores puede acelerar el metabolismo de los microbios donantes. Este es el concepto de sintrofia, que es un tipo de mutualismo y gobierna el metabolismo y el crecimiento de diversos microbios en ecosistemas naturales y de ingeniería (Anwar et al., 2021; Kouzuma et al., 2015).

Funcionalmente, un consorcio microbiano supera la suma de sus partes; sus miembros mantienen la compatibilidad metabólica y ecológica siempre y cuando las transformaciones ambientales que se generan permitan que ellos coexistan cercanamente (Tsoi et al., 2018). Estas asociaciones generan ventajas como la resistencia a cambios, desequilibrios o fluctuaciones del ambiente y pueden promover con el tiempo una mayor estabilidad de un sistema o un proceso biotecnológico (Cyzdik-Kwiatkowska & Zielińska, 2016; Haruta & Yamamoto, 2018).

Dentro de un consorcio microbiano, el intercambio de compuestos químicos o las señales moleculares, son una herramienta de comunicación entre especies. Cada población detecta y responde a la presencia de otras dentro del consorcio, ejerciendo sobre ellas un control positivo o negativo en su crecimiento y/o metabolismo (Kylilis et al., 2018). La comunicación intercelular permite una división de tareas, siendo la suma de ellas, la producción total del consorcio (Tsoi et al., 2018). Otra importante característica de los consorcios es su habilidad para desempeñar funciones que requieren múltiples pasos.

Los consorcios microbianos pueden resistir mejor los periodos de limitación de nutrientes debido a la diversidad metabólica disponible, combinada con la habilidad de compartir metabolitos dentro de la comunidad (Ghosh et al., 2016). Una población minoritaria puede llegar a ser la más activa en un periodo de limitación de nutrientes si tiene la habilidad metabólica capaz de sostener la supervivencia de todo el consorcio. De hecho, el consorcio contiene unas especies minoritarias las cuales han sido retenidas por selección natural para responder a tal situación (Maier et al., 2009). Ante niveles muy bajos de algún nutriente o recurso, los microorganismos no pueden disponer de las cantidades adecuadas para su metabolismo; y, ante niveles muy altos, esos nutrientes y/o recursos pueden causar toxicidad e inhibir el crecimiento. Ante tales fluctuaciones, los consorcios activan sus controles homeostáticos, es decir, reacciones bioquímicas que le permiten al sistema retornar a su equilibrio vital (Deter & Lu, 2022).

1.5.1 Estructura y clasificación de los consorcios microbianos

Los consorcios microbianos se pueden clasificar en diferentes tipos según sus modos de construcción, interacciones y función de los microbios involucrados (Bernstein & Carlson, 2012; Lindemann et al., 2016). Los modos de construcción de un consorcio microbiano se determinan por la intervención humana que se tuvo en este. Un consorcio microbiano natural (NMC por sus siglas en inglés) se refiere a un grupo de microbios que se encuentran viviendo juntos de forma simbiótica en cualquier ecosistema natural. El NMC se usa generalmente para biorremediación, tratamiento de aguas residuales y producción de biogás (Brown et al., 1999; Hammes & Egli, 2005). En un consorcio microbiano artificial (AMC por sus siglas en inglés), diferentes microorganismos silvestres, están creciendo juntos en un sistema cerrado para producir productos valiosos (Kourmentza & Kornaros, 2016). Un AMC puede tener microorganismos creciendo simbióticamente o no. Un consorcio microbiano sintético (SyMC por sus siglas en inglés) consta del co-cultivo de microorganismos que fueron diseñados

metabólicamente para mejorar su rendimiento, mientras que un consorcio microbiano semisintético (SeMC) mezcla microorganismos “salvajes” y microorganismos diseñados metabólicamente para un proceso en específico (Bhatia et al., 2015; Chen et al., 2015).

La clasificación por modos de interacción está dada por relaciones e interacciones ecológicas clásicas. El sinergismo, mutualismo y comensalismo definen la relación e interacción de un consorcio. En la interacción sinérgica, los microbios funcionan dividiendo su trabajo para asegurar el uso paralelo de diferentes sustratos. Tiene un efecto combinado mayor que la suma de sus efectos separados. Cuando se cultivan juntos, podrían consumir el sustrato combinado de manera más eficiente y proporcionar una mayor productividad (Mee et al., 2014; Schink, 2002). El mutualismo considera que todas las especies del consorcio obtienen beneficios como las relaciones dadas en el intestino humano (Bäckhed et al., 2005). El comensalismo es el proceso en donde un microorganismo obtiene beneficios sin afectar a los otros (Wiesmann et al., 2022).

El diseño de consorcios microbianos y las aplicaciones en el campo de la biotecnología requieren un conocimiento aún mayor de las interacciones y funciones microbianas establecidas. Los modos funcionales de un consorcio establecido pueden ayudar a predecir el papel que desempeña cada microorganismo en el consorcio (Duncker et al., 2021). Se tienen cuatro tipos de modos funcionales:

I. Consorcio de mantenimiento del medio ambiente (EMC): Está construido para proporcionar un entorno favorable para el crecimiento del consorcio. Por ejemplo, en un reactor anaerobio de flujo ascendente, un biofilm posee condiciones microaerobias dadas por el consorcio microbiano (Meng et al., 2019).

II. Consorcio de intercambio de nutrientes (NEC): Microorganismos auxótrofos no pueden producir algunas moléculas esenciales bajo específicas condiciones, por lo cual no crecen, sin embargo, en co-cultivo otros microbios proporcionan las moléculas que hacen crecer a estos. Se tiene como ejemplo un consorcio microbiano con la presencia de halomonas y cianobacterias incapaces de sintetizar vitamina B por si solas, pero dentro del consorcio no tenían deficiencias de este factor de crecimiento (Romine et al., 2017).

III. Consorcio facilitador del sustrato (SFC): No todo microorganismo tiene la batería metabólica capaz de hidrolizar todo tipo de polisacáridos para obtener su fuente de carbono. Consorcios en donde algunos microorganismos hidrolicen previamente y produzcan azúcares libres para que otros organismos crezcan serían facilitadores de sustrato y carbono, por ejemplo en la digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos (Wongwilaiwalin et al., 2010).

IV. Consorcio de intercambio de señales (SEC): Microorganismos presentes en consorcios microbianos en los cuales moléculas de señalización inducen a algunas especies a expresar genes crípticos y producir antibióticos y otros metabolitos (Pérez et al., 2011).

1.5.2 Biotecnología de los cultivos mixtos

La biotecnología de los cultivos mixtos (BCM) se refiere a aquellos procesos que, a cambio de seleccionar cultivos puros, se seleccionan cultivos mixtos o consorcios microbianos (Kleerebezem & van Loosdrecht, 2007). Este enfoque de la biotecnología, usa tanto principios de la biotecnología ambiental en el uso de la capacidad metabólica de consorcios microbianos para la transformación de contaminantes, así como principios de la biotecnología industrial, cuyo propósito es el uso de un metabolismo microbiano para la transformación de un sustrato en un compuesto específico de interés comercial. Esta combinación de enfoques se ha usado para mejorar la eficiencia en la obtención de biocombustibles como

metano y biohidrógeno, así como para la producción de biopolímeros (Keshavarz & Roy, 2010; Queirós et al., 2014).

La evolución dirigida parte de un producto de interés a partir del cual se elabora un modelo, teniendo en cuenta los flujos de energía y la estequiometría del proceso metabólico. Con esta información se manipula la alimentación del consorcio de manera continua y controlada en reactores, de tal forma que se obtengan los microorganismos mejor adaptados para llevar a cabo los procesos deseados (Deter & Lu, 2022; Rodríguez et al., 2006). Por otro lado, el desarrollo de consorcios microbianos desde una perspectiva de los modos funcionales como herramienta de la BMC, se ha convertido en una disciplina científica establecida. La metodología se basa en el montaje de consorcios microbianos a través de ensamblajes microbianos forzando las interacciones entre las poblaciones de células distintas y su entorno (Brenner et al., 2008). Un objetivo común es capitalizar tanto las capacidades de los microbios individuales y sus interacciones para crear propiedades emergentes útiles a nivel de sistemas, como el aumento de la productividad, la estabilidad o la funcionalidad metabólica con una oportunidad biotecnológica (Bernstein & Carlson, 2012). Esta metodología ha sido probada para la potencialización de la oxidación anaerobia del ion amonio (Anammox por sus siglas en inglés) en reactores batch (Yasuda et al., 2011).

1.5.3 Actualidad de los consorcios microbianos fijadores de nitrógeno

En el ámbito internacional, la generación de consorcios microbianos para la fijación de nitrógeno se ha dado en la mezcla de cepas puras y su posterior evaluación en suelos bajo diferentes condiciones. Por ejemplo, Aseri y su grupo trabajaron la fertilización de suelos áridos (desierto Thar en India). Una mezcla de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus mosseae* fue el mejor tratamiento, pues incrementó los nutrientes y metabolitos disponibles (N, P, Mg, Ca, Zn, Fe y K),

y las características del cultivo (hojas, clorofila, nitrogenasa, etc) en mayor proporción que con los otros fertilizantes (Aseri et al., 2008).

Abdel-Aziez y su equipo aislaron diferentes bacterias del suelo entre ellas varios géneros de *Azotobacter* y luego inocularon cultivos de la semilla de comino negro cultivado en los Emiratos Árabes Unidos. Ellos detectaron que estas bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas eran las que más beneficiaban el cultivo, aumentado su microflora bacteriana, estimulando el incremento de solubilizadoras de fosfato y el crecimiento de otros géneros de *Azotobacter*, llegando a tener rendimientos de casi el 200% en el crecimiento de la semilla (Abdel-Aziez et al., 2014).

Generalmente, la aplicación biotecnológica hacia la fijación de nitrógeno se ha hecho en su mayoría con cepas puras de diazótrofos, en donde a partir de ecosistemas microbianos estudiados, se realizan aislamientos de microorganismos específicos y son inoculados en ambientes diferentes esperando un aumento en el proceso de fijación de nitrógeno. Sin embargo, existe evidencia de que los consorcios microbianos (agrupaciones ecológicas de dos o más especies) se podrían adaptar mejor a la recuperación del suelo por los efectos sinérgicos que puede conllevar (Bashan, 1998; Conant et al., 2013; Kaur et al., 2022). Se han diseñado consorcios a partir de cianobacterias fijadoras de nitrógeno y se han obtenido hasta tres veces más nitrógeno fijado que cepas aisladas como las de *Nostoc muscorum* (Reyna et al., 2012). Igualmente, estos consorcios fueron empleados en cultivos de arroz logrando el crecimiento de hasta un 150% por encima de la fertilización convencional (Bandyopadhyay et al., 2022; Loredó et al., 2008).

Por otro lado, se ha demostrado que la disminución del 50% (56 kg N/ha de sulfato de amonio) de la aplicación de fertilizante químico a un cultivo de té (Sri Lanka, Asia) puede aumentar hasta 100 veces la densidad bacteriana del suelo,

incrementar la capacidad de FBN y reducir los niveles de nitratos hasta un 70%. Además, utilizando biopelículas de biofertilizantes bacteria-hongo (*Acetobacter spp.*, *Azotobacter spp.*, *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.* Y un *Colletotrichum spp.* no patógeno) se obtuvo 4 veces más la acción de la nitrogenasa, aumentó un 20% el C orgánico disponible en el suelo y aumento de la densidad bacteriana en comparación con el caso anterior (Seneviratne et al., 2011). Ansari, Tipre y Dave evaluaron la eficiencia de diferentes fertilizantes comerciales líquidos en cultivos de garbanzo (Guyarat, India) y encontraron que simulando un consorcio con la mezcla de seis biofertilizantes entre ellos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos se obtienen incrementos de hasta el 140 % en el crecimiento total de la planta (Ansari et al., 2014).

Una diversidad de metabolismos juega roles determinantes en los sistemas de tratamientos de aguas residuales. Con el avance de las técnicas moleculares, se ha profundizado en el estudio del comportamiento y las asociaciones de estas comunidades microbianas. Bai y sus colaboradores realizaron un estudio metagenómico de la rizosfera de las plantas de un humedal construido, detectando la presencia de organismos fijadores de nitrógeno y 14 rutas metabólicas de degradación de compuestos xenobióticos presentes en el agua residual. Ellos concluyeron que los diferentes hábitats y fuentes de carbono favorecen la diversidad de estos ecosistemas (Bai et al. 2014).

Los consorcios de fijadoras de nitrógeno se han implementado en sistemas de tratamiento de aguas residuales - STAR de lodos activados (Rotorua, Nueva Zelanda) diseñados para trabajar sin suministro de nitrógeno con altos niveles de remoción de materia orgánica (hasta el 87%). Se evaluó la influencia del oxígeno disuelto en la capacidad de fijar nitrógeno en el sistema, los niveles de oxígeno disuelto fueron 1.0, 0.3 y 2.2 mg/L obteniéndose las siguientes tasas de fijación de nitrógeno 4.05, 13.49 y 6.92 g N.d⁻¹ respectivamente (Slade et al., 2003). Así mismo, se ha determinado la posible morfología de los consorcios

capaces de fijar nitrógeno, se utilizó un inóculo obtenido de un sistema de tratamiento de residuos de pulpa y papel (Palmerston North, Nueva Zelanda), se inocularon dos Reactores Batch Secuenciados (SBR, por sus siglas en inglés) con el mismo inóculo 1.8 g/L, con y sin fuente de nitrógeno durante 75 días, y se determinó que el sistema de fijación de nitrógeno tiene un tamaño de gránulo (aprox. 10 mm) 10 veces mayor que el sistema no fijador, además que el tiempo de sedimentación de las fijadoras es mayor a 1.4 cm/s y un índice de volumen de lodo de menos de 10 mL/g (Pratt et al., 2007).

Se ha evaluado la estabilidad de los grupos filogenéticos de las bacterias dominantes en un sistema de tratamiento de aguas residuales industriales con altos niveles de remoción de materia orgánica apoyado en altas tasas de fijación de nitrógeno. Se evaluaron los cambios a dos condiciones de oxígeno disuelto 14% y 5%, donde se obtuvo que el cambio de esta condición no genera alteraciones significativas en la comunidad microbiana. Sin embargo, las tasas de fijación de nitrógeno fueron mucho más altas en la condición de 5% de oxígeno disuelto (Reid et al., 2008).

En el contexto nacional, Perez- Pelaez et al., evaluaron los cambios de densidad de algunas poblaciones de bacterias que intervienen en el proceso de tratamiento de las aguas residuales como las bacterias fijadoras de nitrógeno entre otras, esto se hizo en humedales de flujo sub-superficial, (Cali, Colombia) obtuvieron que las poblaciones son afectadas por la carga hidráulica y tipo de planta implementada sobre el humedal de tratamiento (Pérez-Peláez et al., 2011). Adicionalmente, Rodríguez et al (2014), generaron consorcios fijadores de nitrógeno provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas STARD y emplearon uno de estos consorcios en la cosecha de *Coriandrum sativum* (cilantro común). En cuanto a la fijación de nitrógeno, el consorcio microbiano de STARD utilizado como biofertilizante obtuvo mejor resultado comparado con un biofertilizante a base de *Azotobacter Chroococcum*,

al presentar mayores valores de nitrógeno foliar, total, y amoniacal y en variables agronómicas como número de plantas, número de hojas y diámetro de tallo; así mismo de acuerdo con el balance de N_2 se encontraron mayores porcentajes de fijación por parte de las bacterias provenientes de STARD. Adicionalmente, este consorcio empleado disminuyó la concentración de sales en el suelo, aumentó la materia orgánica presente y aumentó la cantidad de nitrógeno reactivo en el suelo después del cultivo (Rodríguez et al., 2014).

Las investigaciones encontradas en la literatura se limitan al uso de cepas puras y en algunos casos de consorcios microbianos para la fijación de nitrógeno y recuperación de suelos. Sin embargo, el usar estos consorcios microbianos como alternativa biotecnológica para la fijación y aprovechamiento del nitrógeno producido durante la fijación está poco estudiado. Razon (2012), planteó una estrategia al proceso Haber Bosch, evaluando el ciclo energético y de gases efecto invernadero a un proceso de producción de sulfato de amonio a partir de Cianobacterias en lagunas algales. Este estudio encontró la eficiencia en fijación de nitrógeno y el aprovechamiento de este, empleando menos energía y generando menos emisiones de gases efecto invernadero que el proceso Haber Bosch. Para el 2014, Razon realizó la evaluación del mismo ciclo energético aprovechando adicionalmente la biomasa generada para la producción de biogás y separando el sulfato de amonio producido en ácido sulfúrico y amoníaco (Razon, 2014). Recientemente se han propuesto metodologías basadas en microbiamas como estrategia para enriquecer consorcios con potencial uso agrícola (Gutierrez et al., 2020) y se ha probado experimentalmente para enriquecer consorcios microbianos fijadores de nitrógeno que una vez inoculados en plantas de tomate logran suplir la demanda de nitrógeno del cultivo (Gutiérrez et al., 2022).

1.6 Bibliografia

- 1) Abdel-aziez, s. M., eweda, w. E., girgis, m. G. Z., & abdel ghany, b. F. (2014). Improving the productivity and quality of black cumin (*nigella sativa*) by using *azotobacter* as n₂ biofertilizer. *Annals of agricultural sciences*, 59(1), 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.06.014>
- 2) Ansari, M. F., Tipre, D. R., & Dave, S. R. (2014). Efficiency evaluation of commercial liquid biofertilizers for growth of *Cicer arietinum* (chickpea) in pot and field study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.010>
- 3) Anwar, M. N., Li, Z. F., & Singh, R. P. (2021). Microbial Syntrophy-Mediated Fortification for Eco-enterprising. *Microbes in Microbial Communities*, 175–194. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5617-0_8
- 4) Arndt, J. A., Aulinger, A., & Matthias, V. (2019). Quantification of lightning-induced nitrogen oxide emissions over Europe. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.12.059>
- 5) Aseri, G. K., Jain, N., Panwar, J., Rao, A. V., & Meghwal, P. R. (2008). Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae*, 117(2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.03.014>
- 6) Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- 7) Bai, Y., Liang, J., Liu, R., Hu, C., & Qu, J. (2014). Metagenomic analysis reveals microbial diversity and function in the rhizosphere soil of a constructed wetland. *Environmental Technology*, 35(17–20), 2521–2527. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.911361>
- 8) Bandyopadhyay, P., Yadav, B. G., Kumar, S. G., Kumar, R., Kogel, K. H., & Kumar, S. (2022). *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* Consortium Facilitates Higher Acquisition of N, P with Improved Carbon Allocation and Enhanced Plant Growth in *Oryza sativa*. *Journal of Fungi*, 8(5), 453. <https://doi.org/10.3390/JOF8050453/S1>

- 9) Bashan, Y. (1998). Inoculants of Plant Growth-Promoting Bacteria for Use in Agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729–770.
- 10) Bell, E. A., Boehnke, P., Harrison, T. M., & Mao, W. L. (2015). Potentially biogenic carbon preserved in a 4.1 billion-year-old zircon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), 14518–14521. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517557112>
- 11) Bernard, G., Pathmanathan, J. S., Lannes, R., Lopez, P., & Baptiste, E. (2018). Microbial Dark Matter Investigations: How Microbial Studies Transform Biological Knowledge and Empirically Sketch a Logic of Scientific Discovery. *Genome Biology and Evolution*, 10(3), 707–715. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy031>
- 12) Bernstein, H. C., & Carlson, R. P. (2012). Microbial Consortia Engineering for Cellular Factories: in vitro to in silico systems. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210017>
- 13) Bhatia, S. K., Bhatia, R. K., Choi, Y.-K., Kan, E., Kim, Y.-G., & Yang, Y.-H. (2018). Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(8), 1209–1229. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471445>
- 14) Bhatia, S. K., Yi, D.-H., Kim, Y.-H., Kim, H.-J., Seo, H.-M., Lee, J.-H., Kim, J.-H., Jeon, J.-M., Jang, K.-S., Kim, Y.-G., & Yang, Y.-H. (2015). Development of semi-synthetic microbial consortia of *Streptomyces coelicolor* for increased production of biodiesel (fatty acid methyl esters). *Fuel*, 159, 189–196. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2015.06.084>
- 15) Bhatt, K., & Maheshwari, D. K. (2020). Zinc solubilizing bacteria (*Bacillus megaterium*) with multifarious plant growth promoting activities alleviates growth in *Capsicum annum* L. *3 Biotech*, 10(2), 36. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2033-9>
- 16) Bitton, G. (2002). *Encyclopedia of environmental microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. 3609 Paj, NY, USA. .
- 17) Bond, D. W., Steiger, S., Zhang, R., Tie, X., & Orville, R. E. (2002). The importance of NO_x production by lightning in the tropics. In *Atmospheric Environment* (Vol. 36).

- 18) Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>
- 19) Brown, D. A., Sherriff, B. L., Sawicki, J. A., & Sparling, R. (1999). Precipitation of iron minerals by a natural microbial consortium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(15), 2163–2169. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00188-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00188-X)
- 20) Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). REVIEW The Evolution and Future of Earth ' s Nitrogen Cycle. 2–6.
- 21) Chen, Y., Kim, J. K., Hirning, A. J., Josić, K., & Bennett, M. R. (2015). SYNTHETIC BIOLOGY. Emergent genetic oscillations in a synthetic microbial consortium. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6251), 986–989. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3794>
- 22) Cheng, M., Xiao, C., & Xie, Y. (2019). Photocatalytic nitrogen fixation: the role of defects in photocatalysts. *Journal of Materials Chemistry A*, 7(34), 19616–19633. <https://doi.org/10.1039/C9TA06435D>
- 23) Cherkasov, N., Ibhaddon, A. O., & Fitzpatrick, P. (2015). A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 90, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.02.004>
- 24) Conant, R. T., Berdanier, A. B., & Grace, P. R. (2013). Patterns and trends in nitrogen use and nitrogen recovery efficiency in world agriculture. *Global Biogeochemical Cycles*, 27(2), 558–566. <https://doi.org/10.1002/gbc.20053>
- 25) Cooper, J. E., & Scherer, H. W. (2011). Nitrogen Fixation. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00016-9>
- 26) Coskun, D., Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (2016). Nutrient constraints on terrestrial carbon fixation: The role of nitrogen. *Journal of Plant Physiology*, 203, 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.05.016>

- 27) Cydzik-Kwiatkowska, A., & Zielińska, M. (2016). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(4), 66. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2012-9>

- 28) Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>

- 29) Deter, H. S., & Lu, T. (2022). Engineering microbial consortia with rationally designed cellular interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 76, 102730. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2022.102730>

- 30) Duncker, K. E., Holmes, Z. A., & You, L. (2021). Engineered microbial consortia: strategies and applications. *Microbial Cell Factories* 2021 20:1, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12934-021-01699-9>

- 31) 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/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CROC00067_0020.GIF

- 32) Elser, J., & Bennett, E. (2011). A broken biogeochemical cycle. *Nature*, 478(7367), 29–31. <https://doi.org/10.1038/478029a>

- 33) Erisman, J. W. (2004). The Nanjing Declaration on Management of Reactive Nitrogen. *BioScience*, 54(4), 286–287. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0286:tndomo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0286:tndomo]2.0.co;2)

- 34) Estrada, G. (2008). Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: Efecto sobre la población, humedad y pH del producto. Pontificia Universidad Javeriana.

- 35) FAO. (2018). The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050. Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura.

- 36) FAO. (2022). El mercado mundial de fertilizantes: balance de la situación de un mercado en dificultades. FAO. <https://investing.com>.

- 37) Favero, V. O., de Carvalho, R. H., Leite, A. B. C., dos Santos, D. M. T., de Freitas, K. M., Boddey, R. M., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., & Urquiaga, S. (2022). Bradyrhizobium strains from Brazilian tropical soils promote increases in nodulation, growth and nitrogen fixation in mung bean. *Applied Soil Ecology*, 175, 104461. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2022.104461>
- 38) Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- 39) Fisher, K., & Newton, W. E. (2002). Nitrogen Fixation at the Millennium. In *Nitrogen Fixation at the Millennium*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044450965-9/50001-X>
- 40) Fissore, C., Baker, L. A., Hobbie, S. E., King, J. Y., McFadden, J. P., Nelson, K. C., & Jakobsdottir, I. (2011). Carbon, nitrogen, and phosphorus fluxes in household ecosystems in the Minneapolis-Saint Paul, Minnesota, urban region. *Ecological Applications*, 21(3), 619–639. <https://doi.org/10.1890/10-0386.1>
- 41) Fixen, P. E., & West, F. B. (2002). Nitrogen Fertilizers: Meeting Contemporary Challenges. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 169–176. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.169>
- 42) Flores, E. (2005). Determinación de comunidades bacterianas y su influencia sobre los ciclos biogeoquímicos de metales en la laguna Carén (Santiago, región metropolitana). Universidad de Santiago de Chile. Facultad de ingeniería.
- 43) Forrest, S. J. K., Schluschaß, B., Yuzik-Klimova, E. Y., & Schneider, S. (2021). Nitrogen Fixation via Splitting into Nitrido Complexes. *Chemical Reviews*, 121(11), 6522–6587. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.0C00958/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CRO0C00958_0113.GIF
- 44) Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., & Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 368(1621).

- 45) Galloway, J. N., Leach, A. M., Erisman, J. W., & Bleeker, A. (2017). Nitrogen: the historical progression from ignorance to knowledge, with a view to future solutions. *Soil Research*, 55(6), 417. <https://doi.org/10.1071/SR16334>
- 46) Gauthier, F., Neufeld, J. D., Driscoll, B. T., & Archibald, F. S. (2000). Coliform Bacteria and Nitrogen Fixation in Pulp and Paper Mill Effluent Treatment Systems Coliform Bacteria and Nitrogen Fixation in Pulp and Paper Mill Effluent Treatment Systems. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5155-5160.2000>.Updated
- 47) Garcia, AK, McShea, H, Kolaczowski, B, Kaçar, B. Reconstructing the evolutionary history of nitrogenases: Evidence for ancestral molybdenum-cofactor utilization. *Geobiology*. 2020; 18: 394– 411. <https://doi.org/10.1111/gbi.12381>
- 48) Ghosh, S., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2016). Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4283–4295. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7448-1>
- 49) Gillingham, M. D., Gomes, R. L., Ferrari, R., & West, H. M. (2022). Sorption, separation and recycling of ammonium in agricultural soils: A viable application for magnetic biochar? *Science of The Total Environment*, 812, 151440. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.151440>
- 50) González-Andrés, F., & James, E. (2016a). Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interactions. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6>
- 51) González-Andrés, F., & James, E. (2016b). Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interactions. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6>
- 52) Good, A. (2018). Toward nitrogen-fixing plants. *Science*, 359(6378), 869–870. <https://doi.org/10.1126/science.aas8737>
- 53) Gu, B., Chang, J., Min, Y., Ge, Y., Zhu, Q., Galloway, J. N., & Peng, C. (2013). The role of industrial nitrogen in the global nitrogen biogeochemical cycle. *Scientific Reports*, 3(1), 2579. <https://doi.org/10.1038/srep02579>

- 54) Guo, W., Zhang, K., Liang, Z., Zou, R., & Xu, Q. (2019). Electrochemical nitrogen fixation and utilization: theories, advanced catalyst materials and system design. *Chemical Society Reviews*, 48(24), 5658–5716. <https://doi.org/10.1039/C9CS00159J>
- 55) 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). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071464>
- 56) 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), 225. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAA225>
- 57) Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000). Recent Advances in Nutritional Sciences. 1081–1084.
- 58) Hammes, F., & Egli, T. (2005). New Method for Assimilable Organic Carbon Determination Using Flow-Cytometric Enumeration and a Natural Microbial Consortium as Inoculum. <https://doi.org/10.1021/ES048277C>
- 59) Haruta, S., & Yamamoto, K. (2018). Model Microbial Consortia as Tools for Understanding Complex Microbial Communities. *Current Genomics*, 19(8), 723–733. <https://doi.org/10.2174/1389202919666180911131206>
- 60) Hatfield, J. L., & Follett, R. F. (2008). Nitrogen in the environment: Sources, problems and management (Second Edi). Elsevier Inc.
- 61) Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
- 62) Houlton, B. Z., & Dahlgren, R. A. (2018). Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth ' s surface environment. 62(April), 58–62.

- 63) Hu, X., Huang, B., Verones, F., Cavalett, O., & Cherubini, F. (2021). Overview of recent land-cover changes in biodiversity hotspots. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 19(2), 91–97. <https://doi.org/10.1002/FEE.2276>
- 64) Huo, Y. X., Wernick, D. G., & Liao, J. C. (2012). Toward nitrogen neutral biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.005>
- 65) Ineson, P. (2006). Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots : the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. 470–476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01104.x>
- 66) Isobe, K., & Ohte, N. (2014). Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments*, 29(1), 4–16. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13159>
- 67) Jasniewski, A. J., Lee, C. C., Ribbe, M. W., Ribbe, M. W., & Hu, Y. (2020). Reactivity, Mechanism, and Assembly of the Alternative Nitrogenases. *Chemical Reviews*, 120(12), 5107–5157. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.9B00704/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR9B00704_0028.GIF
- 68) Jean, M.-E., Phalyvong, K., Forest-Drolet, J., & Bellenger, J.-P. (2013). Molybdenum and phosphorus limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of Eastern Canada: Influence of vegetative cover and seasonal variability. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.018>
- 69) Jetten, M. S. M. (2008). The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*, 10(11), 2903–2909. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01786.x>
- 70) Jiang, X., Payá-Tormo, L., Coroian, D., García-Rubio, I., Castellanos-Rueda, R., Eseverri, Á., López-Torrejón, G., Burén, S., & Rubio, L. M. (2021). Exploiting genetic diversity and gene synthesis to identify superior nitrogenase NifH protein variants to engineer N₂-fixation in plants. *Communications Biology* 2021 4:1, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01536-6>

- 71) Jovino, R. S., da Silva, T. R., Rodrigues, R. T., de Sá Carvalho, J. R., Cunha, J. B. de A., de Lima, L. M., dos Santos, R. C., Santos, C. E. de R. e. S., Ribeiro, P. R. de A., de Freitas, A. D. S., Martins, L. M. V., & Fernandes-Júnior, P. I. (2022). Elite Bradyrhizobium strains boost biological nitrogen fixation and peanut yield in tropical drylands. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(3), 1623–1632. <https://doi.org/10.1007/S42770-022-00792-4/METRICS>
- 72) Kaschuk, G., & Hungria, M. (2017). Diversity and Importance of Diazotrophic Bacteria to Agricultural Sustainability in the Tropics. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (pp. 269–292). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_12
- 73) Kaur, T., Devi, R., Kumar, S., Sheikh, I., Kour, D., & Yadav, A. N. (2022). Microbial consortium with nitrogen fixing and mineral solubilizing attributes for growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Heliyon*, 8(4), e09326. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2022.E09326>
- 74) Kavadia, a., Vayenas, D. V., Pavlou, S., & Aggelis, G. (2008). Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey–one-predator system. *Ecological Modelling*, 218(3–4), 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2008.07.018>
- 75) Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>
- 76) Kessler, P. S., Daniel, C., & Leigh, J. A. (2001). Ammonia switch-off of nitrogen fixation in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*: mechanistic features and requirement for the novel GlnB homologues, NifI(1) and NifI(2). *Journal of Bacteriology*, 183(3), 882–889. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.882-889.2001>
- 77) Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.001>
- 78) Kourmentza, C., & Kornaros, M. (2016). Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source. *Bioresource Technology*, 222, 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.014>

- 79) Kouzuma, A., Kato, S., & Watanabe, K. (2015). Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia. *Frontiers in Microbiology*, 6, 477. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00477>
- 80) Kylilis, N., Tuza, Z. A., Stan, G.-B., & Polizzi, K. M. (2018). Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia. *Nature Communications*, 9(1), 2677. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05046-2>
- 81) Kyriakou, V., Garagounis, I., Vasileiou, E., Vourros, A., & Stoukides, M. (2017). Progress in the Electrochemical Synthesis of Ammonia. *Catalysis Today*, 286, 2–13. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2016.06.014>
- 82) Ladha, J. K., Tirol-Padre, A., Reddy, C. K., Cassman, K. G., Verma, S., Powlson, D. S., van Kessel, C., de B. Richter, D., Chakraborty, D., & Pathak, H. (2016). Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. *Scientific Reports*, 6(1), 19355. <https://doi.org/10.1038/srep19355>
- 83) Leach, A. M., Galloway, J. N., Bleeker, A., Willem, J., Kohn, R., & Kitzes, J. (2012). A nitrogen footprint model to help consumers understand their role in nitrogen losses to the environment. *Environmental Development*, 1(1), 40–66. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2011.12.005>
- 84) Leip, A., Weiss, F., & Lesschen, J. P. (2014). The nitrogen footprint of food products in the European Union. 2014, 20–33. <https://doi.org/10.1017/S0021859613000786>
- 85) Li, L., Tang, C., Jin, H., Davey, K., & Qiao, S. Z. (2021). Main-group elements boost electrochemical nitrogen fixation. *Chem*, 7(12), 3232–3255. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPR.2021.10.008>
- 86) Li, P., Zhou, Z., Wang, Q., Guo, M., Chen, S., Low, J., Long, R., Liu, W., Ding, P., Wu, Y., & Xiong, Y. (2020). Visible-Light-Driven Nitrogen Fixation Catalyzed by Bi5O7Br Nanostructures: Enhanced Performance by Oxygen Vacancies. *Journal of the American Chemical Society*, 142(28), 12430–12439. https://doi.org/10.1021/JACS.0C05097/SUPPL_FILE/JA0C05097_SI_001.PDF

- 87) Liang, L., Ridoutt, B. G., Lal, R., Wang, D., Wu, W., Peng, P., Hang, S., Wang, L., & Zhao, G. (2019). Nitrogen footprint and nitrogen use efficiency of greenhouse tomato production in North China. *Journal of Cleaner Production*, 208, 285–296. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.10.149>
- 88) Lin, J., Chen, N., Yuan, X., Tian, Q., Hu, A., & Zheng, Y. (2020). Impacts of human disturbance on the biogeochemical nitrogen cycle in a subtropical river system revealed by nitrifier and denitrifier genes. *Science of The Total Environment*, 746, 141139. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141139>
- 89) Lindemann, S. R., Bernstein, H. C., Song, H.-S., Fredrickson, J. K., Fields, M. W., Shou, W., Johnson, D. R., & Beliaev, A. S. (2016). Engineering microbial consortia for controllable outputs. *The ISME Journal*, 10(9), 2077–2084. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.26>
- 90) Liu, H. (2014). Ammonia synthesis catalyst 100 years: Practice, enlightenment and challenge. *Chinese Journal of Catalysis*, 35(10), 1619–1640. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(14\)60118-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(14)60118-2)
- 91) Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 5970–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- 92) Loredó, J., Reyna, R., Cueto, F., & Cañizares, O. (2008). Capacidad de biofertilización de un consorcio microbiano fotosintético fijador de nitrógeno. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 10811. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9342-4>.
- 93) Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Edition (15th ed.). Pearson Educación.
- 94) Maier, R. M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2009). *Environmental Microbiology*. In *Unknown Journal*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00001-8>
- 95) Mamphogoro, T. P., Babalola, O. O., & Aiyegoro, O. A. (2020). Sustainable management strategies for bacterial wilt of sweet peppers (*Capsicum annum*) and other Solanaceous crops. *Journal of Applied Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14653>

- 96) Mardamootoo, T., Preez, C. C. du, & Barnard, J. H. (2021). Phosphorus management issues for crop production: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 17(7), 939–952. <https://doi.org/10.5897/AJAR2020.15205>
- 97) Masepohl, B. (2015). Regulation of Nitrogen Fixation and Molybdenum Transport in *Rhodobacter capsulatus*. In *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 121–130). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch11>
- 98) Mee, M. T., Collins, J. J., Church, G. M., & Wang, H. H. (2014). Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), E2149–E2156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405641111>
- 99) Mehta, M. P., & Baross, J. A. (2006). Nitrogen fixation at 92 degrees C by a hydrothermal vent archaeon. *Science* (New York, N.Y.), 314(5806), 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1134772>
- 100) Meng, J., Li, J., He, J., Li, J., Deng, K., & Nan, J. (2019). Nutrient removal from high ammonium swine wastewater in upflow microaerobic biofilm reactor suffered high hydraulic load. *Journal of Environmental Management*, 233, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.027>
- 101) Milton, R. D., & Minteer, S. D. (2019). Nitrogenase Bioelectrochemistry for Synthesis Applications. *Accounts of Chemical Research*, 52(12), 3351–3360. https://doi.org/10.1021/ACS.ACCOUNTS.9B00494/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AR9B00494_0007.GIF
- 102) Motavaf, B., Capece, S. H., Eldor, T., & Savage, P. E. (2022). Recovery of Energy and Nitrogen via Two-Stage Valorization of Food Waste. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 61(33), 12064–12072. https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.2C00200/ASSET/IMAGES/MEDIUM/IE2C00200_0007.GIF
- 103) Mottakin, M., Selvanathan, V., Mandol, S., Mosaddek Hossen, M., Nurunnabi, M., Haider, J. bin, Hasan, M., Althubeiti, K., Sarkar, D. K., Shahinuzzaman, M., Abdullah, H., & Akhtaruzzaman, M. (2022). Sustainable production of oxalic acid from waste cane sugar molasses via systemic recycling of nitrogen oxide. *Journal of Cleaner Production*, 339, 130704. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.130704>

- 104) Muchovej, R. M. C., & Rechcigl, J. E. (2020). Impact of Nitrogen Fertilization of Pastures and Turfgrasses on Water Quality. *Soil Processes and Water Quality*, 91–135. <https://doi.org/10.1201/9781003070184-3>
- 105) Mus, F., Colman, D. R., Peters, J. W., & Boyd, E. S. (2019a). Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.01.050>
- 106) Mus, F., Colman, D. R., Peters, J. W., & Boyd, E. S. (2019b). Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.01.050>
- 107) Myrold, D. D. (2021). Transformations of nitrogen. *Principles and Applications of Soil Microbiology*, Third Edition, 385–421. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820202-9.00015-0>
- 108) Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udworthy, D., Varghese, N., Schulz, F., Wu, D., Paez-Espino, D., Chen, I.-M., Huntemann, M., Palaniappan, K., Ladau, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., Nielsen, T., Kirton, E., Faria, J. P., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., ... Consortium, I. D. (2021). A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nature Biotechnology*, 39(4), 499–509. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6>
- 109) Newton, W. E. (2006). *Biology of the Nitrogen Cycle: COST edition*. ISBN 0080469442
- 110) Noar, J. D., & Bruno-Barcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, 164, 421–436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>
- 111) Oita, A., Malik, A., Kanemoto, K., Geschke, A., Nishijima, S., & Lenzen, M. (2016). Substantial nitrogen pollution embedded in international trade. *Nature Geoscience*, 9(2), 111–115. <https://doi.org/10.1038/ngeo2635>
- 112) Okon, Y., Houchins, J. P., Albrecht, S. L., & Burris, R. H. (1977). Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen, and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. *Journal of General Microbiology*, 98(1), 87–93.

- 113) Ospina-Betancourth, C., Acharya, K., Allen, B., Head, I. M., Sanabria, J., Curtis, T. P., & member, W. (2021)a. 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>
- 114) Ospina-Betancourth, C., Acharya, K., Sanabria, J., & Curtis, T. P. (2021)b. Low inhibitory effect of ammonia on the nitrogen-fixing activity of a sludge enriched with nitrogen-fixing bacteria. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100655. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100655>
- 115) Paknia, O., Rajaei Sh., H., & Koch, A. (2015). Lack of well-maintained natural history collections and taxonomists in megadiverse developing countries hampers global biodiversity exploration. *Organisms Diversity & Evolution*, 15(3), 619–629. <https://doi.org/10.1007/s13127-015-0202-1>
- 116) Pappu, A. R., Bhattacharjee, A. S., Dasgupta, S., & Goel, R. (2017). Nitrogen Cycle in Engineered and Natural Ecosystems—Past and Current. *Current Pollution Reports*, 3(2), 120–140. <https://doi.org/10.1007/s40726-017-0051-y>
- 117) Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Braña, A. F., Shimkets, L. J., Sevillano, L., & Santamaría, R. I. (2011). *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 175–183. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00208.x>
- 118) Pérez-Peláez, N. R., Peña-Varón, M. R., & Sanabria, J. (2011). Comunidades bacterianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en humedales construidos. 92(2), 83–92. *Ingeniería y competitividad*. Cali, Colombia. <https://doi.org/10.25100/iyv.v13i2.2676>
- 119) Poly, F., Monrozier, L., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1), 95–103.
- 120) Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., & Monrozier, L. J. (2001). Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2255–2262. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001>

- 121) Prakash, C. S., Fiaz, S., Nadeem, M. A., Baloch, F. S., & Qayyum, A. (Eds.). (2023). Sustainable Agriculture in the Era of the OMICs Revolution. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-15568-0>
- 122) Pratt, S., Tan, M., Gapes, D., & Shilton, A. (2007). Development and examination of a granular nitrogen-fixing wastewater treatment system. *Process Biochemistry*, 42(5), 863–872. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.009>
- 123) Price, E. J., Vitale, C. M., Miller, G. W., David, A., Barouki, R., Audouze, K., Walker, D. I., Antignac, J. P., Coumoul, X., Bessonneau, V., & Klánová, J. (2022). Merging the exposome into an integrated framework for “omics” sciences. *IScience*, 25(3), 103976. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2022.103976>
- 124) Qian, K., Ryan P. Rodgers, Christopher L. Hendrickson, Mark R. Emmett, A., & Marshall, A. G. (2001). Reading Chemical Fine Print: Resolution and Identification of 3000 Nitrogen-Containing Aromatic Compounds from a Single Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrum of Heavy Petroleum Crude Oil. *Energy Fuels*, 15 (2), pp 492–498. <https://doi.org/10.1021/EF000255Y>
- 125) Queirós, D., Rossetti, S., & Serafim, L. S. (2014). PHA production by mixed cultures: a way to valorize wastes from pulp industry. *Bioresource Technology*, 157, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.099>
- 126) Rai, A. N. (2019). Nitrogen Metabolism. *Handbook of Lichenology*, 201–238. <https://doi.org/10.1201/9780429291784-9>
- 127) Ravishankara, A. R., Daniel, J. S., & Portmann, R. W. (2009). Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5949), 123–125. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>
- 128) Razon, L. F. (2012). Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 107, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.075>

- 129) Razon, L. F. (2014). Life cycle analysis of an alternative to the haber-bosch process: Non-renewable energy usage and global warming potential of liquid ammonia from cyanobacteria. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33(2), 618–624. <https://doi.org/10.1002/ep.11817>
- 130) Razon, L. F. (2018). Reactive nitrogen: A perspective on its global impact and prospects for its sustainable production. *Sustainable Production and Consumption*, 15, 35–48. <https://doi.org/10.1016/J.SPC.2018.04.003>
- 131) Reay, D. S., Smith, P., Christensen, T. R., James, R. H., & Clark, H. (2018). Methane and Global Environmental Change. *Annual Review of Environment and Resources*, 43(1), 165–192. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102017-030154>
- 132) Reid, N. M., Bowers, T. H., & Lloyd-Jones, G. (2008). Bacterial community composition of a wastewater treatment system reliant on N₂ fixation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 285–292. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1413-6>
- 133) Reyna, R., Vázquez, M., & Cañizares, O. (2012). Isolation of a photosynthetic microbial consortium formed mainly by cyanobacteria with capacity to fix nitrogen. 4, 183–196.
- 134) Rodríguez, J., Kleerebezem, R., Lema, J. M., & van Loosdrecht, M. C. M. (2006). Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(3), 592–606. <https://doi.org/10.1002/bit.20765>
- 135) 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* 2021, Vol. 8, Page 55, 8(5), 55. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING8050055>
- 136) Rodriguez, M., Daza, M. C., & Sanabria, J. (2014). Biofertilización De Nitrógeno En Suelos Salinos A Partir De Consorcios Microbianos Obtenidos De Sistemas De Tratamiento De Aguas Residuales Domésticas. *Maestría en Ingeniería, Énfasis en Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. EIDENAR. Universidad del Valle
- 137) Romine, M. F., Rodionov, D. A., Maezato, Y., Osterman, A. L., & Nelson, W. C. (2017). Underlying mechanisms for syntrophic metabolism of essential enzyme cofactors in microbial communities. *The ISME Journal*, 11(6), 1434–1446. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.2>

- 138) Rosado, A. S., Duarte, G. F., Seldin, L., & Van Elsas, J. D. (1998). Genetic Diversity of nifH Gene Sequences in Paenibacillus azotofixans Strains and Soil Samples Analyzed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments. Appl. Envir. Microbiol., 64(8), 2770–2779.
- 139) Rutledge, H. L., & Tezcan, F. A. (2020). Electron Transfer in Nitrogenase. Chemical Reviews, 120(12), 5158–5193. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.9B00663/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR9B00663_0026.GIF
- 140) Sanz, J. L., & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. Process Biochemistry, 42(2), 119–133.
- 141) Schaechter, M. (2010). Desk encyclopedia of microbiology. Access Online via Elsevier.
- 142) Schink, B. (2002). Synergistic interactions in the microbial world. Antonie van Leeuwenhoek, 81(1–4), 257–261. <https://doi.org/10.1023/a:1020579004534>
- 143) Sellami, M., Elrayess, M. A., Puce, L., & Bragazzi, N. L. (2022). Molecular Big Data in Sports Sciences: State-of-Art and Future Prospects of OMICS-Based Sports Sciences. Frontiers in Molecular Biosciences, 8, 1356. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.815410/BIBTEX>
- 144) Seneviratne, G., Jayasekara, A. P. D. A., De Silva, M. S. D. L., & Abeysekera, U. P. (2011). Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry, 43(5), 1059–1062. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.01.026>
- 145) Serna-Chavez, H. M., Fierer, N., & van Bodegom, P. M. (2013). Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. Global Ecology and Biogeography, 22(10), 1162–1172. <https://doi.org/10.1111/geb.12070>
- 146) Shipman, M. A., & Symes, M. D. (2017). Recent progress towards the electrosynthesis of ammonia from sustainable resources. Catalysis Today, 286, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.05.008>

- 147) Skinner, C., Gattinger, A., Muller, A., Mäder, P., Fließbach, A., Stolze, M., Ruser, R., & Niggli, U. (2014). Greenhouse gas fluxes from agricultural soils under organic and non-organic management — A global meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 468, 553–563.
- 148) Slade, A. H., Anderson, S. M., & Evans, B. G. (2003). Nitrogen fixation in the activated sludge treatment of thermomechanical pulping wastewater: effect of dissolved oxygen. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 48(8), 1–8.
- 149) Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2019). To fix or not to fix: Controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 85, Issue 6). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>
- 150) Smil, V. (2004). *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production*. MIT Press.
- 151) 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>
- 152) Song, Y., Johnson, D., Peng, R., Hensley, D. K., Bonnesen, P. V., Liang, L., Huang, J., Yang, F., Zhang, F., Qiao, R., Baddorf, A. P., Tschaplinski, T. J., Engle, N. L., Hatzell, M. C., Wu, Z., Cullen, D. A., Meyer, H. M., Sumpter, B. G., & Rondinone, A. J. (2018). A physical catalyst for the electrolysis of nitrogen to ammonia. *Science Advances*, 4(4), e1700336. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700336>
- 153) Stevens, C. J. (2019). Nitrogen in the environment. *Science*, 363(6427), 578–580. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV8215>
- 154) Stevens, C. J., David, T. I., & Storkey, J. (2018). Atmospheric nitrogen deposition in terrestrial ecosystems: Its impact on plant communities and consequences across trophic levels. *Functional Ecology*, 32(7), 1757–1769. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13063>

- 155) Stüeken, E. E., Kipp, M. A., Koehler, M. C., & Buick, R. (2016). The evolution of Earth's biogeochemical nitrogen cycle. *Earth-Science Reviews*, 160, 220–239. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.07.007>
- 156) Thamdrup, B. (2012). New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 407–428. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145048>
- 157) Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A., Gibbons, S. M., Ackermann, G., Navas-Molina, J. A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J. T., Mirarab, S., Xu, Z. Z., Jiang, L., ... Zhao, H. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 2017 551:7681, 551(7681), 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature24621>
- 158) Tissot, B. P., & Welte, D. H. (1984). *Petroleum Formation and Occurrence*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-87813-8>
- 159) Townsend, A. R., Braswell, B. H., Holland, E. A., & Penner, J. E. (1996). Spatial and Temporal Patterns in Terrestrial Carbon Storage Due to Deposition of Fossil Fuel Nitrogen. *Ecological Applications*, 6(3), 806–814. <https://doi.org/10.2307/2269486>
- 160) Tsoi, R., Wu, F., Zhang, C., Bewick, S., Karig, D., & You, L. (2018). Metabolic division of labor in microbial systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), 2526–2531. https://doi.org/10.1073/PNAS.1716888115/SUPPL_FILE/PNAS.1716888115.SAPP.PDF
- 161) Uwizye, A., de Boer, I. J. M., Opio, C. I., Schulte, R. P. O., Falcucci, A., Tempio, G., Teillard, F., Casu, F., Rulli, M., Galloway, J. N., Leip, A., Erisman, J. W., Robinson, T. P., Steinfeld, H., & Gerber, P. J. (2020). Nitrogen emissions along global livestock supply chains. *Nature Food* 2020 1:7, 1(7), 437–446. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0113-y>
- 162) Velázquez, J. (2005). Determinación de la comunidad microbiana en biorreactores mediante técnicas de biología molecular. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.

- 163) Vincent, A. T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A. I., & Charette, S. J. (2017). Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 60–71. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.02.016>
- 164) 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>
- 165) Wanrosli, W. D., Zainuddin, Z., Law, K. N., & Asro, R. (2007). Pulp from oil palm fronds by chemical processes. *Industrial Crops and Products*, 25(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.07.005>
- 166) Watt, J. G. (2003). A brief history of the Chilean nitrates industry. *CIM Bulletin*, 96(1073), 84–88.
- 167) Weeks, M. E. (1933). o f NITROGEN '. *Journal of Chemical Education*, 1, 101–107.
- 168) Wenz, J., Davis, J. G., & Storteboom, H. (2019). Influence of light on endogenous phytohormone concentrations of a nitrogen-fixing *Anabaena* sp. cyanobacterium culture in open raceways for use as fertilizer for horticultural crops. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3371–3384. <https://doi.org/10.1007/S10811-019-01856-Z/METRICS>
- 169) Wiesmann, C. L., Wang, N. R., Zhang, Y., Liu, Z., & Haney, C. H. (2022). Origins of symbiosis: shared mechanisms underlying microbial pathogenesis, commensalism and mutualism of plants and animals. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAC048>
- 170) Wisniak, J., & Garcés, I. (2001). The Rise and Fall of the Salitre (Sodium Nitrate) Industry. *Indian Journal of Chemical Technology*, 8, 427–438.
- 171) Witschi, H. (2000). Fritz Haber: December 9, 1868-January 29, 1934. *Toxicology*, 149(1), 3–15. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00227-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00227-4)
- 172) Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., & Champreda, V. (2010). Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading

microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(6), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.07.013>

173) Xiang, N., Guo, C., Liu, J., Xu, H., Dixon, R., Yang, J., & Wang, Y. P. (2020). Using synthetic biology to overcome barriers to stable expression of nitrogenase in eukaryotic organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28), 16537–16545. https://doi.org/10.1073/PNAS.2002307117/SUPPL_FILE/PNAS.2002307117.SD02.PDF

174) Xu, Y., Ramanathan, V., & Victor, D. G. (2018). Global warming will happen faster than we think. *Nature*, 564(7734), 30–32. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07586-5>

175) Yasuda, T., Waki, M., Yoshinaga, I., Amano, T., Suzuki, K., Tanaka, Y., Yamagishi, T., & Suwa, Y. (2011). Evidence of exponential growth of an anammox population in an anaerobic batch culture. *Microbes and Environments / JSME*, 26(3), 266–269.

176) Zehr, J. P., & Capone, D. G. (2021). Nitrogen Fixation in the Marine Environment. *Marine Nitrogen Fixation*, 1–7. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67746-6_1

177) Zhang, D., Liu, J., Li, B., Zhang, D., Liu, J., & Li, B. (2014). Tackling Air Pollution in China—What do We Learn from the Great Smog of 1950s in LONDON. *Sustainability*, 6(8), 5322–5338. <https://doi.org/10.3390/su6085322>

178) Zhang, X., Tong, J., Dong, M., Akhtar, K., & He, B. (2022). Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production. *PeerJ*, 10, e12677. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.12677/SUPP-9>

CAPÍTULO II ENRIQUECIMIENTO DE CONSORCIOS MICROBIANOS PROVENIENTES DE INÓCULOS NATIVOS EN BIOREACTORES

2.1. Introducción

De manera natural, durante millones de años y equilibradamente en toda la biosfera, la primera etapa para la formación de N_r ha sido desarrollada por diazótrofos. Estos microorganismos están presentes en hábitats de todos los tipos, como glaciares, suelos, océanos y hasta en intestinos de animales (Gupta et al., 2019; Liang et al., 2020). Su diversidad no se distribuye uniformemente entre los grupos filogenéticos o entre los ecosistemas, teniéndose la carencia de que, en la actualidad, los entornos más diversos son los menos caracterizados y como resultado existe una carente descripción de diazótrofos y una cantidad de metabolismos y microorganismos por descubrir e identificar (Han et al., 2019).

El proceso de fijación biológica de nitrógeno se considera un paso limitante y determinante en el ciclo del nitrógeno, dado que está restringido a un limitado número de procariotas (González-Andrés & James, 2016). Este proceso, puede ser inhibido por múltiples variables fisicoquímicas como lo son el pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y presencia de amonio (Han et al., 2019). Sin embargo, la diversidad genética proporciona la capacidad a largo plazo de la biosfera para persistir y adaptarse a cambios abióticos abruptos o graduales (Mori et al., 2018).

Desde la biotecnología, queda el reto de poder integrar conceptos de ecología microbiana e ingeniería de bioprocesos para poder aprovechar la diversidad de diazótrofos existentes en múltiples ambientes y poder seleccionar a partir de allí consorcios microbianos que puedan ser usados para diferentes fines de interés tecnológico. En este sentido, conociendo los ambientes en los que se podría encontrar una alta diversidad de diazótrofos y sus condiciones básicas de

crecimiento, se podrían diseñar estrategias de selección y enriquecimiento de estos consorcios.

En este capítulo se evalúa el uso de biorreactores en batch para el enriquecimiento de consorcios microbianos fijadores de nitrógeno en medios libres de nitrógeno reactivo. Como inóculos fueron empleados un suelo de vocación agrícola y nativos y sistemas de tratamiento de aguas residuales tanto industriales como domésticos.

2.2. Metodología

Procedencia de inóculos

Cuatro inóculos fueron seleccionados teniendo en cuenta la posible presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en ecosistemas microbianos antropogénicos, naturales y naturales intervenidos con el fin de obtener inóculos con diferencias en diversidad y abundancia. El primer inóculo proviene del reactor de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas - ARD (Denominado durante este experimento como inóculo **A**), ubicado en el Distrito de Santiago de Cali – Valle del Cauca ($3^{\circ}23'18.78''$ N – $76^{\circ}30'48.00''$ O). El segundo inóculo es un suelo proveniente de una finca cañicultora ubicada en el municipio de Palmira- Valle del Cauca ($3^{\circ}35'00.21''$ N $76^{\circ}19'59.34''$ O), en donde por más de 30 años han sido cultivadas constantemente diferentes variedades de caña de azúcar (Denominado durante este experimento como inóculo **C**). Como tercer inóculo se empleó un suelo virgen del Parque Natural Nacional Farallones de Cali ($3^{\circ}35'.11.77''$ N – $76^{\circ}37'.37.23''$), el cual nunca ha sido usado en agricultura (Denominado durante este experimento como inóculo **F**). Por último, se utilizó un inóculo de una planta anaerobia empleada en la depuración de las aguas residuales industriales -ARI generadas en la producción industrial de levadura para pan (denominado durante este experimento como inóculo **L**), ubicada en el municipio de Tuluá-Valle del Cauca ($4^{\circ}04'07.17''$ N – $76^{\circ}11'51.21''$).

Aclimatación

Se tomaron 250 gramos de cada muestra, fueron macerados y tamizados en un tamiz de 3 mm para la remoción de sólidos, raíces, rocas u objetos. Después se agregó cada muestra por separado a una botella con 1 litro de solución salina (8.5% de NaCl), agitación 200 RPM x 12 h y $30\pm 2^\circ$ de temperatura con el propósito de homogeneizar y remover la mayor cantidad de materia orgánica e inorgánica disuelta. Posterior a las 12 horas, se realizó un proceso de sedimentación en un cono imhoff durante 40 minutos, se retiró el sobrenadante y nuevamente se agregaron a botellas con 1 litro de solución salina para repetir el paso de la remoción de materia orgánica e inorgánica disuelta. Finalmente, después de una segunda sedimentación, se tomó cada muestra y se le adicionó 1 L de un medio de cultivo líquido libre de nitrógeno (Medio 441 DSMZ RBA modificado) (tabla 2.1) el cual fue burbujeado durante 24 horas con nitrógeno gaseoso con el fin de eliminar la mayor cantidad de protozoos y microinvertebrados aerobios posibles (Rodríguez et al, 2014). Al final, 250 mL de sedimento de cada botella después de 40 minutos se tomó como el inóculo base para cada reactor de enriquecimiento.

Cada inóculo fue llevado a un reactor de 1 litro con agitación mediante shaker y aireación (3 Litros de aire por minuto) por siete días, el cual es el tiempo promedio de crecimiento celular de diazótrofes en condiciones de cultivo líquido (Rodríguez et al, 2014). Posteriormente cada uno de los inóculos se agitó y de la mezcla completa de medio e inóculo (Licor mixto) se tomó 250 mL, los cuales se adicionaron en un reactor con 500 mL de medio RBA modificado para un volumen total de 750 mL.

Tabla 2.2 Medio RBA modificado		
Solución A (cantidades para 1L)		
KH ₂ PO ₄	0.1	g
K ₂ HPO ₄	0.9	g
NaCl	0.1	g

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.1	g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.005	g
MnSO ₄ x H ₂ O	0.005	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.01	g
Solución de micronutrientes	3	mL
Solución B (cantidades para 50 mL)		
Sacarosa	20	g
Piruvato de Na	1	g
D-Manitol	2	g
D-Glucosa	2	g

Las soluciones A y B se ajustaron a un pH final de 7,3. Se esterilizan la solución A y B separadamente, se enfrían a 50°C y se adiciona a la solución B 5 mL de la solución de vitaminas, posteriormente se mezclan y se almacena a 4°C-. La solución de micronutrientes contiene (para 1L): ZnSO₄ x 7 H₂O 0.1g; MnCl₂ x 4 H₂O 0.03g; H₃BO₃ 0.3g; CoCl₂ x 6 H₂O 0.2g; CuCl₂ x 2 H₂O 0.01g; NiCl₂ x 6 H₂O 0.02g; Na₂MoO₄ x 2 H₂O 0.03 g.

La figura 2.1 presenta las fases de alimentación. La primera fase de alimentación constó de ciclos de 24 horas de mezcla completa y aireación (3 LPM), 1 hora de sedimentación y el cambio del sobrenadante por nuevo medio con el fin de garantizar la menor cantidad de materia orgánica nitrogenada y nitrógeno disuelto en el medio para así favorecer el crecimiento de diazótrofes. Esta fase se llevó a cabo hasta que la coloración de cada bioreactor se tornó amarillenta y se evidenció que la materia orgánica que traía cada muestra fue consumida.

Se procedió a arrancar la segunda fase de alimentación. En esta fase, los ciclos de alimentación cambiaron y son tres; el primero, consta de tomar 250 mL de licor mixto (mezcla de inóculo y sustrato en agitación) del reactor y se alimenta con 250 mL de medio por 72 horas, posteriormente en la etapa dos, se agregan 250 mL más de sustrato y se opera durante 72 horas. Cuando estas 48 horas finalizan, el reactor se deja sedimentar por 1 hora, se extraen 500 mL del

sobrenadante y se reemplazan por 500 mL de nuevo medio, se alimenta por 72 horas. Cuando este tiempo finaliza se toman 250 mL de este licor mixto y se reinicia el ciclo con el paso 1.

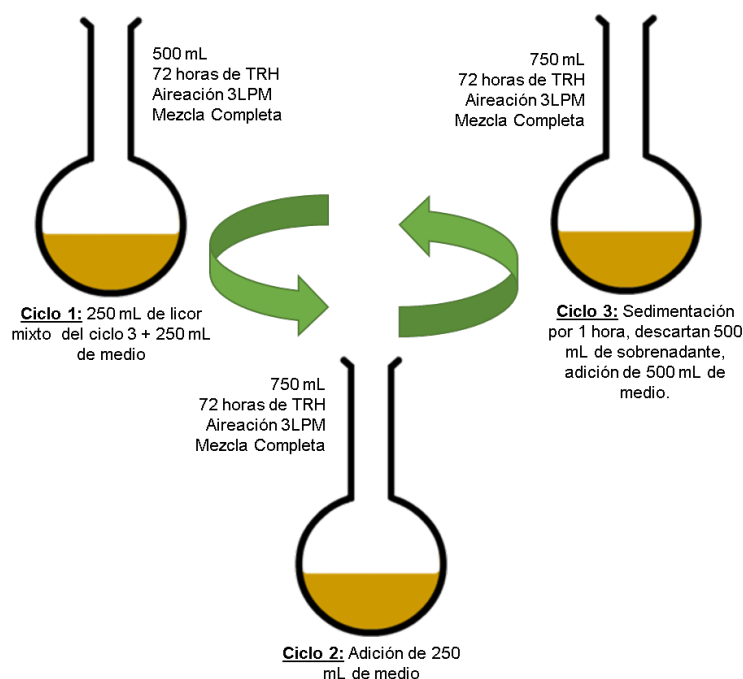


Figura 2.1 Esquema de alimentación de los reactores durante el tiempo de operación

Evaluación de grupos cultivables y pruebas bioquímicas

Se realizó la identificación de los géneros asociados con la fijación de nitrógeno, complementando las identificaciones con siembras de tres réplicas en medios selectivos, Eosina-Azul de Metileno (EMB), Macconkey, Manitol-Levadura (MYA), Polimixina-Yema de huevo-Manitol (MYP), Cetrimide, Actinomicetos, Ashby, NFb y JNFb (Baldani et al., 2014; Dadook et al., 2014; de Vos et al., 2015; Imhoff, 2005; Tallent et al., 2012). Enzimas codificadas genéticamente como catalasas, ureasas, peroxidasas, entre otras, son verificadas y determinadas por pruebas bioquímicas.

Extracción de ADN, secuenciación y análisis taxonómico

Se tomó una alícuota del efluente de cada reactor para extracción de ADN en el tiempo inicial (1A; 1C; 1F y 1L) y tiempo final (2A; 2C; 2F y 2L). La extracción de ADN se realizó de forma manual. El ADN extraído fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EE. UU) y revelado en gel de agarosa al 1%. 50 μ l de cada muestra fueron enviados a Novogene (EE. UU). La secuenciación se realizó mediante la plataforma Illumina para la región v3 y v4 (NovaSeq 6000 PE150). Las lecturas crudas fueron evaluadas usando el programa FASTQC para revisar el estado de calidad de las lecturas, posteriormente, fueron procesadas en QIIME2 con el plugin DADA2 para remover quimeras, secuencias repetidas y secciones de mala calidad (Q30). Las lecturas se truncaron en 271 pb para eliminar secuencias de mala calidad (Q 30), y los singletons fueron descartados como parte del proceso dentro del DADA2. La asignación taxonómica se realizó con la base de datos SILVA (SILVA SSU 138.1) usando el método “fit-classifier-naïve-Bayes”, y las tablas de características fueron procesadas en R (R Core Team, 2021) para realizar las gráficas de abundancia, índices de alfa diversidad y distancias de beta diversidad.

2.3. Resultados y discusión

Análisis de cultivabilidad de los inóculos

La densidad de bacterias generales en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo (UFC/g), fue estimada por conteos directos de colonias en placa, a partir de muestras de suelo de las localidades Farallones (F) y Candelaria (C), y lodos de Aguas residuales domésticas (A) y Aguas residuales industriales (L) en agar nutritivo (tabla 2.2).

Tabla 3.2 Número de colonias en UFC/g de las muestras de suelos y lodos de las diferentes localidades en medio RBA

Localidad	UFC/g
F	1,09x10 ⁶
C	3,00 x10 ⁷
A	3,00 x10 ⁷
L	1,07 x10 ⁷

La tabla 2 indica que la densidad de bacterias generales en UFC/g de suelo y lodo fue mayor en los ecosistemas C y A, mientras que la localidad F, presentó la menor densidad. Este resultado podría ser explicado por la alta concentración de moléculas carbonadas y elementos minerales de las aguas residuales domésticas. Para el caso de la localidad C, que corresponde a un suelo agrícola, se obtuvieron conteos mayores con respecto a F que corresponde a un suelo no intervenido. Esto puede ser explicado debido a que, en el suelo agrícola, como consecuencia de las labores de fertilización, hay disponibilidad de nutrientes, lo que favorece el crecimiento de bacterias heterótrofas que metabolizan fuentes simples de nutrientes como las que se pueden encontrar en el medio RBA, mientras que, para los microorganismos de un suelo no intervenido, allí la disponibilidad de nutrientes puede ser más compleja y esto causa que al llevarlos a un medio de rápido crecimiento, no se obtengan conteos abundantes. Se debe tener en cuenta que la distribución ecológica de las bacterias en ecosistemas específicos está modulada por diversos factores como características químicas y físicas de los sustratos, humedad, materia orgánica, pH e interacciones microbianas (Han et al., 2019)

Luego de hacer las siembras en placa, se lograron identificar 16 morfotipos, 12 se observaron en la localidad F, ocho en la C, siete en A y nueve en L. El aislamiento de estos microorganismos en medio libre de nitrógeno permitió asociarlos con microorganismos capaces de fijar nitrógeno. Se ha reportado que estos géneros presentan actividades metabólicas que promueven el crecimiento vegetal (PGP), y han sido aislados de cultivos de gran interés para la alimentación humana (Beneduzi et al. 2013, Hungria et al. 2013). La producción

de metabolitos en estos géneros, les permiten establecer interacciones y llevar a cabo procesos, como solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fitohormonas y fijación de nitrógeno (Tabassum et al. 2017).

A los morfotipos caracterizados macroscópicamente, se les realizó pruebas bioquímicas y siembras en medios selectivos, logrando identificar los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Citrobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Escherichia*. No se observó crecimiento en agar Cetrimide, indicando que dentro de los aislados no se obtuvo colonias del género *Pseudomonas*. No se pudo comprobar la presencia de *Herbaspirillum* ni *Azospirillum*, a través de los medios de cultivo JNFb y NFb.

Se ha reportado que estos géneros encontrados presentan actividades metabólicas que promueven el crecimiento vegetal (PGP), y han sido aislados de cultivos de gran interés para la alimentación humana (Mendes et al., 2013; Vanegas & Uribe-Vélez, 2014; Wiesmann et al., 2022). La producción de metabolitos en estos géneros, les permiten establecer interacciones y llevar a cabo procesos, como solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fitohormonas y fijación de nitrógeno.

Cambios estructurales en la comunidad microbiana

Se aprecia también que se generan comunidades diferentes después del proceso de adaptación dependiendo del inóculo. En algunos inóculos hay un aumento en la diversidad después del proceso de enriquecimiento mientras que en otros la diversidad se disminuye (figura 2.3).

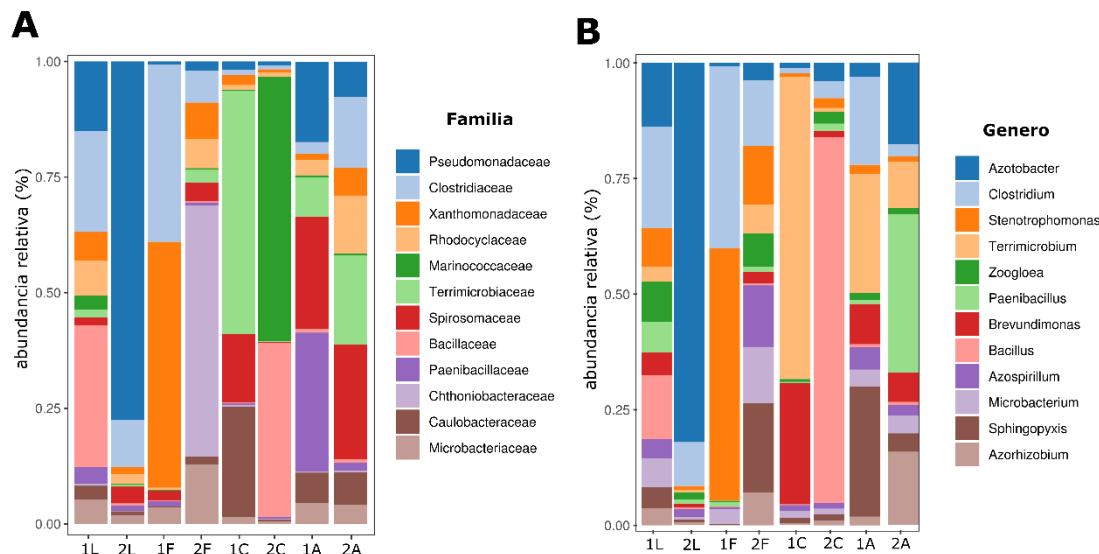


Figura 2.2 Abundancia relativa al nivel taxonómico de familia (A) y genero (B). Se muestran los taxones más abundantes. 1L: ARI tiempo inicial, 2L: ARI tiempo final, 1F: farallones tiempo inicial, 2F: farallones tiempo final, 1C: Candelaria tiempo inicial, 2C: Candelaria tiempo final, 1A: ARD tiempo inicial, 2A: ARD tiempo final.

Los índices de diversidad muestran que el inóculo inicial de Farallones (1F) es que tiene una abundancia menor de microorganismos (Chao_1 y ACE) y que dentro de esos pocos microorganismos hay una dominancia alta (Dominance) de un par de taxones (*Terrimicrobioum* y *Clostridium*) lo que causa una baja diversidad (Shannon). Después del proceso de enriquecimiento, se aprecia un cambio en todas las métricas de diversidad, mostrando una desaparición de los grupos dominantes y aparición de nuevos grupos que en un principio estaban en una muy baja abundancia.

El análisis de beta diversidad (figura 2.4A) muestra dos grandes clados claramente diferenciados en donde se agrupan las muestras antes y después del proceso de enriquecimiento, a excepción de la muestra 1A y 2A que aparentemente no sufrió cambios significativos en la estructura microbiana durante el proceso. Se aprecia que para las muestras 1F y 1A que en el tiempo inicial eran muy diferentes, después del proceso de enriquecimiento, son las que más se parecen en términos de la configuración de la comunidad microbiana.

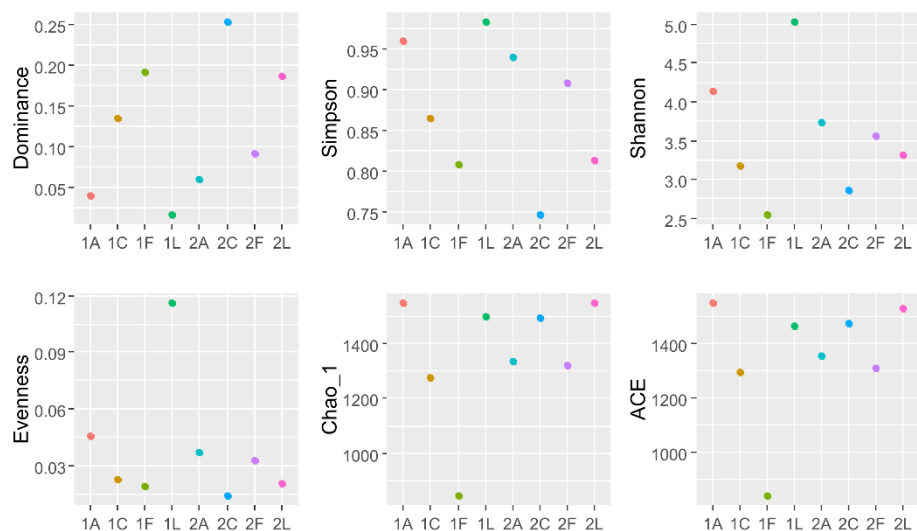


Figura 2.3 Índices de alfa diversidad. 1L: ARI tiempo inicial, 2L: ARI tiempo final, 1F: farallones tiempo inicial, 2F: farallones tiempo final, 1C: Candelaria tiempo inicial, 2C: Candelaria tiempo final, 1A: ARD tiempo inicial, 2A: ARD tiempo final.

En la figura 2.4B se indican en círculos azules correlaciones estadísticamente significativas entre taxones a nivel de genero con base en abundancias relativas en el tiempo final. Las correlaciones positivas podrían indicar sinergias entre los taxones. No se evidencian correlaciones negativas. Se observa correlación entre *Azospirillum* con *Microbacterium* y *Zooglea*. Esta correlación podría indicar algún tipo de asociación entre estos tres géneros, en este caso *Azospirillum* ha sido reportado como fijador de nitrógeno, sin embargo, los otros dos no, razón por la cual su mecanismo en la asociación podría estar relacionado con formación de biopelículas y consumo rápido de oxígeno para proteger el complejo enzimático de la nitrogenasa (Gutiérrez et al., 2022). Una asociación similar podría pensarse para el caso de *Clostridium*, que ha sido reportado como anaerobio obligado, sin embargo, está presente en reactores aerobios con inyección de aire. Su presencia allí podría estar explicada por su capacidad para fijar nitrógeno y su correlación con *Strenotrophomonas* puede indicar que este último forma biopelículas que

rodean a *Clostridium*, aislándolo del oxígeno, pero permitiendo la difusión de nitrógeno molecular.

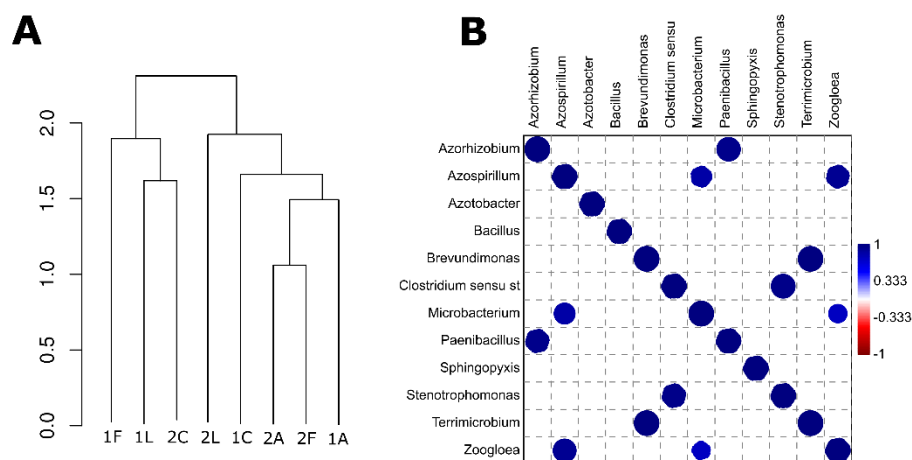


Figura 2.4. (A) Agrupación basada en distancias de Bray Curtis. 1L: ARI tiempo inicial, 2L: ARI tiempo final, 1F: farallones tiempo inicial, 2F: farallones tiempo final, 1C: Candelaria tiempo inicial, 2C: Candelaria tiempo final, 1A: ARD tiempo inicial, 2A: ARD tiempo final. (Matriz de correlación de Pearson basada en las abundancias relativas en el tiempo final, se muestran en círculos azules correlaciones estadísticamente significativas $p < 0,05$).

Al cambiar las condiciones originales del inóculo, la estructura microbiana a nivel taxonómico presenta cambios. En algunos casos se aumenta la diversidad y en otros se disminuye. Es probable que los cambios observados obedecen a la composición nutricional del medio de cultivo y la presión selectiva para el crecimiento de algunos géneros. Sin embargo, la magnitud de los cambios obedece también a la composición inicial del inóculo, puesto que cada inóculo configuró en el tiempo final una comunidad microbiana diferente de los demás. Esto confronta la hipótesis de que se podrían obtener comunidades microbianas parecidas en tanto se cultiven en las mismas condiciones, lo que se conoce como ensamblajes determinísticos (Mori et al., 2018). Se han realizado procesos de enriquecimiento similares a partir de muestras de suelo, en donde al igual que la muestra de farallones, se presenta un aumento en la diversidad cuando el inóculo es cultivado en un reactor con un medio líquido (Gutiérrez et al., 2022).

2.3.3. Caracterización fisicoquímica de los reactores

La tabla 2.3 muestra que, para los 4 inóculos, independientemente de su procedencia, al final del proceso de adaptación, se logró aumentar la cantidad de nitrógeno en cada reactor llegando incluso al doble de la cantidad inicial. La cantidad de carbono se mantuvo constante haciendo que al final la relación carbono nitrógeno se disminuyera. Estos resultados son importantes y se constituyen en aporte a la investigación en producción de biomasa microbioma fijadora de nitrógeno en reactores usando nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno. Comúnmente la industria de producción de microorganismos fijadores de nitrógeno no usa nitrógeno atmosférico, se usan fuentes de nitrógeno fácilmente asimilable que se añaden a los caldos fermentativos (Aloo et al., 2021; Gupta, 2021; Joshi & Gauraha, 2022; Sansinenea, 2021), en este estudio se presenta un buen rendimiento en términos de crecimiento microbiano y aumento de la concentración de nitrógeno en los reactores a partir del N₂ atmosférico, sugiriendo una alternativa biotecnológica que puede ser menos costosa para la producción de biofertilizantes, inóculos de interés biotecnológicos o metabolitos secundarios. No se observaron cambios notorios en el contenido de oxígeno. El oxígeno es importante en la fijación de nitrógeno, puesto que inhibe irreversiblemente el complejo enzimático de la nitrogenasa, en este caso no se observó un efecto negativo del oxígeno en la fijación de nitrógeno. La tabla 2.3 presenta los análisis elementales realizados a las muestras en su tiempo inicial y final de operación.

Tabla 2.4 Caracterización elemental del efluente de los reactores al tiempo inicial y tiempo final de operación.

	N	C	H	O	C/N
1L	1,31	41,23	5,11	52,15	31,47
2L	2,34	40,9	5,25	50,98	17,48
1F	1,17	43,35	5,01	50,21	37,05
2F	2,46	40,19	5,12	52,09	16,34

1C	1,44	42,36	5,26	50,36	29,42
2C	2,15	40,98	5,19	51,48	19,06
1A	1,26	42,13	5,21	51,07	33,44
2A	2,24	41,78	5,42	50,45	18,65

1L: ARI tiempo inicial, 2L: ARI tiempo final, 1F: farallones tiempo inicial, 2F: farallones tiempo final, 1C: Candelaria tiempo inicial, 2C: Candelaria tiempo final, 1A: ARD tiempo inicial, 2A: ARD tiempo final.

La figura 2.5 muestra la concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente del reactor durante los 35 días de operación para cada uno de los 4 inóculos. Se aprecia un incremento en los primeros días de operación para L, A y C, alcanzando los valores máximos a los 9 días (figura 2.5). El inóculo F tarda un poco más en alcanzar el valor máximo, lográndolo a los 14 días. Para el inóculo L, se aprecia que después de alcanzar su concentración máxima, se presenta un descenso rápido a los 14 días y nuevamente un aumento a los 17 días. Después de alcanzar su punto máximo, para todos los inóculos, la concentración de nitrógeno amoniacal desciende alcanzando puntos mínimos entre los 28 y 33 días de operación, punto desde el cual aumenta nuevamente.

Los resultados sugieren que una baja concentración de nitrógeno amoniacal en el medio induce a la fijación de nitrógeno y por ende se aumenta la concentración de este en los días posteriores. Esta rápida fijación de nitrógeno puede estar haciendo que el nitrógeno fijado se incorpore rápidamente en la biomasa como nitrógeno orgánico y haya un rápido crecimiento de los microorganismos. Una vez que los microorganismos empiezan a morir, parte de este nitrógeno es liberado al medio y empieza a ser transformado a nitratos, empieza a ser consumido por otros microorganismos presentes que no fijan nitrógeno y es liberado nuevamente en forma gaseosa.

Una vez hay poco nitrógeno amoniacal en el medio, se activa nuevamente la fijación de nitrógeno y empieza a aumentar la concentración. Esta dinámica en el proceso de fijación de nitrógeno responde al hecho de que biológicamente a

nivel celular, la expresión de la enzima nitrogenasa está regulada por la concentración de NH_4 que el microorganismo es capaz de detectar en su ambiente, cuando hay NH_4 disponible, la expresión de la enzima es reprimida, mientras que cuando hay poco NH_4 disponible, la expresión de la enzima es inducida (Smercina et al., 2019).

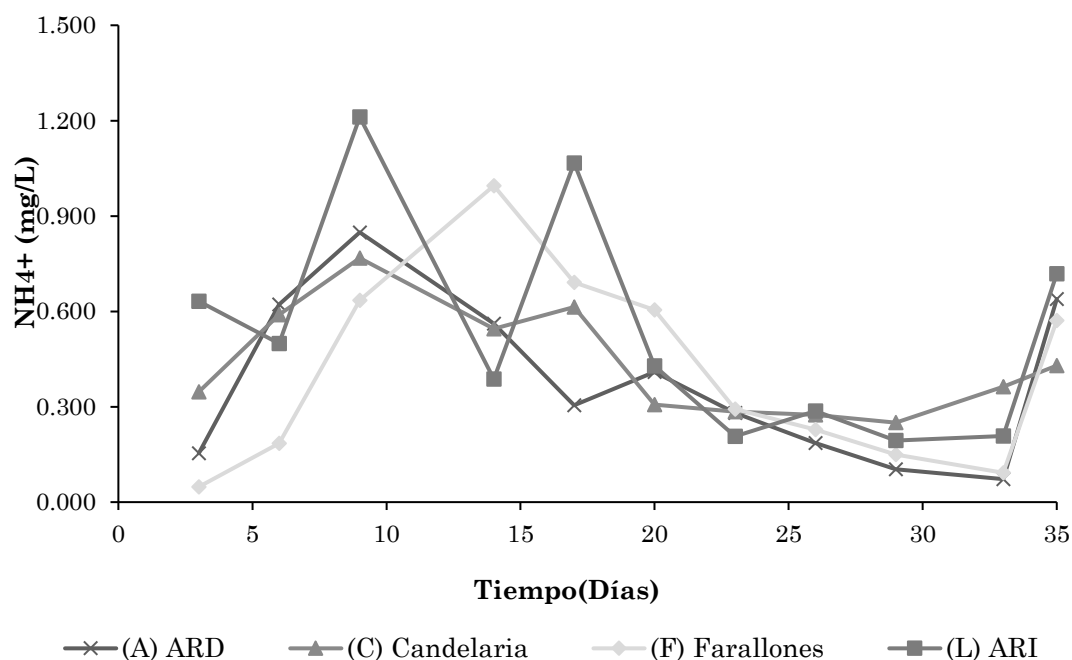


Figura 2.5 Concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente del reactor durante el tiempo de operación

2.4. Conclusiones

El proceso de enriquecimiento fue exitoso en la medida que permitió el crecimiento de microorganismos usando como única fuente de nitrógeno el aire atmosférico, estos microorganismos a su vez aumentaron la cantidad de nitrógeno en el efluente, indicando la presencia de fijadores de nitrógeno. Por otra parte, se pudieron identificar fijadores de nitrógeno en los cuatro inóculos utilizados. Se evidencian cambios a nivel de la composición de la comunidad microbiana de cada inóculo antes y después del proceso de adaptación y se logran identificar

algunas asociaciones que posiblemente facilitan el proceso de fijación. Este tipo de asociaciones antes mencionadas no son frecuentes en la literatura para el caso de los fijadores de nitrógeno, puesto que el estudio de estos microorganismos se ha enfocado en el uso de cultivos puros. En este caso con datos experimentales se logra mostrar la relevancia del uso de biorreactores y consorcios microbianos complejos para estudiar relaciones ecológicas entre microorganismos y que se puedan obtener beneficios con potencial industrial a partir de estas asociaciones, independientemente de la procedencia del inóculo.

2.5. Bibliografía

- 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>
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384(1–2), 413–431. <https://doi.org/10.1007/S11104-014-2186-6/METRICS>
- Beneduzi, A. Moreira, F., Costa, P., Vargas, L., Lisboa, B., Favreto, r., Baldani, J. and Passaglia, L. (2013). "Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil". *Applied Soil Ecology*, 63, pp. 94-104.
- Dadook, M., Mehrabian, S., Salehi, M., & Irian, S. (2014). Morphological, Biochemical and Molecular Characterization of Twelve Nitrogen-Fixing Bacteria and Their Response to Various Zinc Concentration. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(4), 9415. <https://doi.org/10.5812/JJM.9415>
- De Vos, A., Janssens, R., VandeVelde, H., Haentjens, P., Bonduelle, M., Tournaye, H., & Verheyen, G. (2015). The type of culture medium and the duration of in vitro culture do not influence birthweight of ART singletons. *Human Reproduction*, 30(1), 20–27. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEU286>
- González-Andrés, F., & James, E. (2016). Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interactions. In *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6>

- Gupta, K. (2021). Biofertilizers Industry Profiles in Market. *Biofertilizers*, 541–559. <https://doi.org/10.1002/9781119724995.CH18>
- Gupta, V. V. S. R., Zhang, B., Penton, C. R., Yu, J., & Tiedje, J. M. (2019). Diazotroph Diversity and Nitrogen Fixation in Summer Active Perennial Grasses in a Mediterranean Region Agricultural Soil. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 115. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2019.00115/BIBTEX>
- 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). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071464>
- Han, L. L., Wang, Q., Shen, J. P., Di, H. J., Wang, J. T., Wei, W. X., Fang, Y. T., Zhang, L. M., & He, J. Z. (2019). Multiple factors drive the abundance and diversity of the diazotrophic community in typical farmland soils of China. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(8). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIZ113>
- Hungria, M., Nogueira, M.A. and Araujo, R.S. (2013). C, o-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability”, *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 49(7), pp.791–801.
- Imhoff, J. F. (2005). “Enterobacteriales”. *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology*, 587–850. https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_13
- Joshi, S. K., & Gauraha, A. K. (2022). Global biofertilizer market: Emerging trends and opportunities. *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy*, 689–697. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91595-3.00024-0>
- Liang, J., Yu, K., Wang, Y., Huang, X., Huang, W., Qin, Z., Wang, G., Su, H., Chen, B., & Wu, Z. (2020). Diazotroph Diversity Associated With Scleractinian Corals and Its Relationships With Environmental Variables in the South China Sea. *Frontiers in Physiology*, 11, 615. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00615/BIBTEX>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 5, pp. 634–663). <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mori, A. S., Isbell, F., & Seidl, R. (2018). b-Diversity, Community Assembly, and Ecosystem Functioning. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(7). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.04.012>

- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing* (4.1). R Foundation for Statistical Computing.
- Sansinenea, E. (2021). Application of biofertilizers: Current worldwide status. *Biofertilizers: Volume 1: Advances in Bio-Inoculants*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00004-X>
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2019). To fix or not to fix: Controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 85, Issue 6). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, 121(November 2016), 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>
- Tallent, S. M., Kotewicz, K. T. M., Strain, E. A., & Bennett, R. W. (2012). Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 95(2), 446–451. <https://doi.org/10.5740/JAOACINT.11-251>
- Vanegas, J., & Uribe-Vélez, D. (2014). Selection of mixed inoculants exhibiting growth-promoting activity in rice plants from undefined consortia obtained by continuous enrichment. *Plant and Soil*, 375(1–2), 215–227. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1960-1>
- Wiesmann, C. L., Wang, N. R., Zhang, Y., Liu, Z., & Haney, C. H. (2022). Origins of symbiosis: shared mechanisms underlying microbial pathogenesis, commensalism and mutualism of plants and animals. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAC048>

CAPITULO III EVALUACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS FIJADORES DE NITRÓGENO EN CADENA DE VALORIZACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

3.1 Introducción

Se estima que a nivel mundial la biomasa lignocelulósica es un recurso biológico ampliamente disponible con un rendimiento anual de más de 200 mil millones de toneladas métricas secas por año (Raja *et al.*, 2008). Lo equivale a un rendimiento energético como combustible estimado en $9,1 \times 10^{18}$ J, aproximadamente lo mismo que 1.000 millones de barriles de Diesel (Lee *et al.*, 2020). Esta biomasa puede ser aprovechada energéticamente para la producción de energías limpias, entre estas, el biogás. En un contexto local, la producción agrícola anual promedio se estima en 73,2 millones de toneladas al año, teniendo residuos agrícolas y pecuarios ricos en carbono que pueden ser aprovechados energéticamente para la producción de energías limpias, entre estas, el biogás. Además de representar una alternativa para la generación de energía térmica y eléctrica, también brinda la oportunidad de suministrar energía eléctrica en las regiones más apartadas del país, y permite desplazar el uso de combustibles fósiles ampliamente utilizados como el gas natural, el carbón y los combustibles líquidos, por residuos agrícolas que pueden ser fuente de biocombustibles sostenibles a nivel mundial (UPME, 2015).

El valle geográfico del río Cauca cuenta con características topográficas, climáticas y de suelos ideales para la producción de caña de azúcar, procesando cerca de 24 millones de toneladas de caña de azúcar al año. El residuo más importante derivado del procesamiento de la caña de azúcar es el bagazo, representando cerca del 30 % del total de la caña molida, generando en promedio 7 millones de toneladas (Becerra Quiroz, Buitrago Coca and Pinto Baquero, 2016). Lograr aportar a la población una estrategia de aprovechamiento de este material de forma amigable con el medio ambiente y que proporcione

alternativas para la producción de energías renovables, lograría minimizar el impacto ambiental generado por la combustión de los hidrocarburos y contribuir a la necesidad mundial de producción de energías limpias.

La composición del bagazo es aproximadamente 42% de celulosa, 25% hemicelulosa, y un 20% de lignina (Yue *et al.*, 2016). El bagazo ofrece muchas ventajas para el uso en los procesos de bioconversión que utilizan microorganismos debido a que es una fuente potencial de carbono para un proceso de producción de energía de segunda generación (Aguiar *et al.*, 2021). Sin embargo, el bagazo se caracteriza además por una relación C/N de 116:1, donde la falta de nitrógeno en el bagazo es evidente (Janke *et al.*, 2015) y dado que los polisacáridos que lo componen están unidos en una estructura compleja, este residuo es casi inerte contra cualquier acción bioquímica.

Igualmente, la importancia del crecimiento del cultivo de Palma de Aceite Africana en Colombia, ubicándose como el cuarto productor de este alimento en el mundo, hace que su residuo se convierte en una materia prima con un potencial de aprovechamiento energético. En el proceso de beneficio del fruto de palma de aceite se generan varios subproductos de interés técnico y económico tanto para la planta de beneficio como para el manejo agronómico del cultivo de palma de aceite (Nasir *et al.*, 2019; Pelaez *et al.*, 2022) Para el caso de la fase sólida se produce raquis, lo cual proviene de la remoción de los frutos de la palma y la fibra, proveniente de la molienda del fruto en la extracción del aceite. Así mismo, las extractoras de aceite de palma africana son generadoras de grandes cantidades de efluentes líquidos con una alta carga orgánica contaminante. Dichos efluentes son conocidos por sus siglas en inglés como POME (Palm Oil Mill Effluents), y se refiere a los efluentes de las etapas finales del proceso de producción del aceite de palma en las plantas extractoras.

La digestión anaeróbica (AD) se ha consolidado como una tecnología madura, ampliamente estudiada y sostenible, capaz de convertir la materia orgánica presente de varios tipos de desechos en biogás, una fuente de energía renovable que puede reemplazar al gas natural y a los combustibles convencionales para producir calor y energía (Harirchi *et al.*, 2022). (Achinas, Achinas and Euverink, 2017; Harirchi *et al.*, 2022) Adicionalmente, su digestato, puede ser empleado como fertilizante o acondicionador de suelos, lo que le da un valor agregado a una dicha alternativa (Uçkun Kiran *et al.*, 2016; Wang, Chang and Lee, 2023). La digestión anaerobia tiene varias ventajas sobre otros tratamientos de residuos y procesos de producción bioenergética. Esto se debe a que reduce los olores y las emisiones de gases de efecto invernadero, como CH₄ y óxido nitroso que, respectivamente, tienen 25 y 298 veces más potencial de calentamiento global que el CO₂ en una escala de cien años (IPCC, 2019). Además, esta tecnología puede transformar la materia orgánica en una fuente de bioenergía: biogás (compuesto principalmente de metano y dióxido de carbono), a la vez que estabiliza los desechos y produce un fertilizante rico en nutrientes que puede aplicarse a la tierra para obtener beneficios agronómicos (Vasco-Correa *et al.*, 2018).

En este sentido, el biogás producido a través de la digestión anaeróbica (AD) se ha convertido en una alternativa para la producción de energía, no solo por las ventajas medioambientales, de usar residuos como materia prima para producir biogás y un fertilizante de alta calidad (digestato) como sus principales productos, sino también por su costo relativamente bajo en comparación con otras técnicas (Kasinath *et al.*, 2021). De hecho, cualquier tipo de biomasa tiene el potencial de ser un sustrato para la producción de biogás siempre que contengan carbohidratos, proteínas, grasas, celulosa y hemicelulosas como componentes principales (Okolie *et al.*, 2022).

Aunque la producción de biogás a partir de residuos ricos en carbono es una estrategia prometedora, esta tecnología se enfrenta a diversos retos que conciernen al máximo aprovechamiento de los residuos agrícolas. Dado que, los residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña o POME a menudo son ricos en carbohidratos, pero son bajos en nitrógeno (Deshavath, Veeranki and Goud, 2019). La digestión anaerobia de estos sustratos suele producir un biogás alto en dióxido de carbono (CO_2) pero significativamente bajo en contenido de CH_4 . De igual manera, aunque la biomasa lignocelulósica es una opción para la producción de biocombustibles gracias a su composición rica en carbono, su producción a gran escala se ha visto limitada debido a su pobre contenido de nitrógeno, lo que dificulta su degradación microbiana (Jiang *et al.*, 2019).

La digestión anaeróbica de la materia orgánica es un proceso complejo, pues los microorganismos que participan en el proceso tienen diferentes requisitos sobre las condiciones ambientales y, además, conviven en interacciones sinérgicas. De esta manera, si cierto sustrato tiene una relación C: N alta, es decir, una deficiencia de nitrógeno puede influir negativamente en el funcionamiento de la comunidad microbiana. Lo cual se traduce en una influencia directa en la capacidad de producir enzimas que son necesarias para la utilización del carbono, causando una conversión incompleta del sustrato y menores rendimientos de metano. Igualmente, una C:N baja puede causar la inhibición del proceso de AD, a través de la acumulación de amoníaco tóxico (NH_3) producido de la degradación de proteínas o por la conversión de urea (Jiang *et al.*, 2019).

Existe un potencial uso de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas para la producción de combustibles a partir de biomasa, se han descrito varias especies de bacterias celulolíticas anaeróbicas a partir de sedimentos, compost y lodos anaerobios (Tsegaye *et al.*, 2019; Anukam *et al.*, 2020). Dado que los ambientes ricos en celulosa son frecuentemente deficientes en nitrógeno, las bacterias

fermentadoras de celulosa capaces de fijar nitrógeno satisfacen sus necesidades de nitrógeno a través de la fijación de N_2 ya que tienen una ventaja selectiva (Harindintwali *et al.*, 2022).

En este sentido, este capítulo evaluará la contribución de la combinación de consorcios de microorganismos fijadores de nitrógeno y lodos de digestión anaerobia en la producción de biogás a partir residuos agrícolas con deficiencias en relaciones C:N. De esta manera, esta alternativa de tratamiento de compuestos lignocelulósicos aportará información valiosa en la generación de una cadena de valor industrial, capaz de contribuir con el abastecimiento de la demanda energética mediante alternativas industriales más sostenibles.

3.2 Metodología

Este proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología, del Grupo de Investigación en Bioprocesos de la Universidad ICESI y el Laboratorio del Grupo de Investigación en Procesos Avanzados para Tratamientos Biológicos y Químicos (GAOX) de la Universidad del Valle. Esta metodología, tiene como objetivo lograr determinar la contribución de la combinación de consorcios de microorganismos fijadores de nitrógeno y lodos de digestión anaerobia en la producción de biogás a partir de residuos de caña de azúcar y palma de aceite.

3.2.1 Selección de inóculos y sustratos

El inóculo o lodo de digestión anaerobia – IB, fue tomado del reactor de flujo ascendente anaeróbico de lecho de lodos o reactor UASB por sus siglas en inglés (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) de la estación de investigación y transferencia de tecnología en aguas residuales y reúso de Ginebra, Valle del Cauca (3°42'40.18" N – 76°16'15.55 O).

Se hizo un muestreo integrado del sistema según su régimen de mezcla. Se tomó una muestra de 40 litros en recipientes, los cuales fueron llevados al laboratorio de investigación en bioprocesos de la Universidad Icesi. El consorcio de bacterias fijadoras de nitrógeno – BFN fue el producto de la aclimatación del lodo proveniente de un sistema de tratamiento de aguas residuales de la industria de producción de levadura, denominado en el capítulo anterior como inóculo L y se tomó teniendo en cuenta la afinidad en su procedencia original para la producción de biogas.

Para el caso de los sustratos, el bagazo de caña se obtuvo de un ingenio azucarero ubicado en el municipio de Palmira, Valle del Cauca (3°35'00.21" N 76°19'59.34" O), mientras que los residuos de Palma de Aceite de una finca palmícola en el municipio de Codazzi -Cesar. Ambos residuos fueron recolectados en bolsas ziploc empacadas al vacío, a temperatura ambiente y transportadas hasta las instalaciones de la Universidad ICESI para su preservación y procesamiento.

3.2.2 Caracterización fisicoquímica de inóculos y sustratos

Inóculos

Se calculó el porcentaje de sólidos volátiles (%VS) del lodo de digestión anaerobia y cada uno de los sustratos de acuerdo con el protocolo Solids 2549 sección C y E establecido por el “Standard methods for the examination of water and wastewater – 2017”.

Sustratos

Los residuos fueron caracterizados en su contenido de nutrientes y diferentes formas de materia orgánica lignocelulósica, de acuerdo con los procedimientos establecidos por National Renewable Energy Laboratory – NREL de los Estados

Unidos (NREL, 2008), en el Instituto Fraunhofer para Tecnología Química ICT (Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie ICT), en Pfinztal Alemania.

3.2.3 Evaluación de fuentes de carbono por parte de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno - BFN

Teniendo en cuenta que en la digestión anaerobia de los residuos lignocelulósicos existen fuentes de carbono diferentes a las evaluadas durante el capítulo II, se determinó que era necesario evaluar el consumo de compuestos orgánicos como el ácido acético y la celulosa por parte del consorcio de bacterias fijadoras de nitrógeno. La celulosa y el ácido acético son dos de los principales productos de las etapas de la digestión anaerobia de residuos lignocelulósicos.

Para realizar el cultivo del inóculo del consorcio BFN se tomaron frascos Schott de 500mL con 130 mL del medio RBA modificado, sin ninguna fuente de carbono y 20 mL del consorcio BF, cada experimento se realizó por triplicado. Para el caso del ácido acético se llevó una concentración de 400 mg/L al reactor y se ajustó el pH a 7.3 unids con solución buffer de K_2HPO_4 . Mientras que, para el caso de la celulosa, se agregó una concentración de 500 mg/L.

Los reactores se tuvieron en condiciones de incubación 35°C y 150 rpm, semejando las condiciones de la digestión anaerobia, a través de una atmósfera saturada de nitrógeno y tomando nueve muestras de 5 mL a lo largo de 20 días de experimento. Se cuantificó Carbono Orgánico Total – COD al sobrenadante de cada muestra centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos y el peso seco a la fracción a la muestra secada por 24 horas a 105°C.

3.2.4 Evaluación del potencial de biometano - BMP

Previamente determinado el VS de cada sustrato e inóculo, se procedió a realizar los ensayos BMP. La relación inóculo:sustrato fue de 6:1, teniendo como volumen

de reacción 700 mL y siguiendo la guía VDI 4630 de la Asociación Alemana de Ingenieros para la caracterización de sustrato, muestreo, recolección de información y tests de fermentación (Richtlinie Verein Deutscher Ingenieure VDI 4630 "Vergärung organischer Stoffe; Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche").

Los experimentos se llevaron a cabo en dos equipos BMP-Nautilus suministrados por ANAERO Technologies (Cambridge, Reino Unido) (Figura 3.1). La temperatura de los experimentos fue de 30 ± 2 °C. El biogás producido durante los experimentos fue almacenado en bolsas Tedlar y su composición determinada mediante un BIOGAS 5000 (Geotech, UK). A cada combinación de experimento se le realizaron tres réplicas.



Figura 7 Set para test de potencial de biometano (Anaero Technology, UK).

Fueron evaluados tres sustratos; dos provenientes de la palma de aceite y uno de la caña de azúcar. Para el caso de la caña de azúcar fue el bagazo, mientras que para la palma de aceite se evaluó el POME líquido y el raquis.

3.2.5 Diseño experimental

Se realizaron tres tratamientos a cada sustrato que consistieron en un enriquecimiento con 10% de un consorcio de fijadoras de nitrógeno (IB + BFN +

Sustrato), con fijadoras de nitrógeno esterilizadas (IB + BFN_{AC} + Sustrato) y sin fijadoras de nitrógeno (IB + Sustrato), con el objetivo de evaluar si la actividad del consorcio de microorganismos fijadoras de nitrógeno tenía un efecto significativo sobre la producción de biogás con los distintos sustratos o por el contrario, el contenido nutricional del consorcio microbiano por sí era una fuente de nutrientes debido a su contenido de material celular, detritos y nutrientes. Se tuvieron como blancos un montaje de inóculo con celulosa (IB + Celulosa) y el inóculo sin sustrato (IB) para observar la capacidad endógena del inóculo de producir biogas.

3.2.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se empleó la prueba no paramétrica basada en el rango H de Kruskal-Wallis para corroborar si existían diferencias relevantes a nivel estadístico entre dos o más grupos de una variable independiente en una variable dependiente ordinal o continua. La prueba determinó si las medianas de dos o más grupos son diferentes. Las hipótesis de la prueba fueron:

H₀: Las medianas de la producción de biogas son iguales.

H₁: las medianas de la producción de biogas no son iguales

Se empleó el software Minitab 17, con un nivel de significancia del 95% para todas las pruebas.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Caracterización fisicoquímica de inóculos y sustratos

Los resultados obtenidos en la caracterización de cada una de las muestras se llevaron a cabo según lo descrito en la metodología. En la tabla 3.1 se presenta

el promedio de los resultados obtenidos durante el procedimiento para inóculos experimentales. La celulosa es un polisacárido compuesto por cadenas lineales de glucano envueltas por hemicelulosa y lignina, que están unidas por enlaces químicos. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina están estrechamente entrelazadas para formar una estructura sólida de la pared (Usman Khan and Kiaer Ahring, 2021). Este factor físico, limita la efectividad de la eficacia de la digestión anaerobia y plantea enfoques de pretratamiento físico y químico selectivo, como la molienda, la extrusión, las microondas, la explosión de fibras de amoníaco, los disolventes eutécticos, entre otros (Mankar *et al.*, 2021).

Tabla 3.5 Promedio del porcentaje de sólidos volátiles y sólidos totales de lodo de digestión anaerobia y del consorcio de bacterias fijadoras de nitrógeno (BF)

	Lodo de digestión anaerobia (IB)	Consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno (BF)
% Sólidos Volátiles (p/p)	2.03 ± 0.05	0.53 ± 0.01
% Sólidos Totales (p/p)	4.21 ± 0.10	0.66 ± 0.01
% Humedad	95.79 ± 0.01	99.34 ± 0.01

El contenido de sólidos volátiles para el inóculo IB fue casi cuatro veces mayor al del consorcio fijador de nitrógeno, denotando mayor contenido de material celular y concentración de compuestos orgánicos. Así mismo, los sólidos totales tuvieron el mismo comportamiento, lo que está asociado a la densidad celular y de material del tipo de reactor de manto de lodos ascendentes, el cual densifica la biomasa.

La tabla 3.2 presenta la caracterización fisicoquímica de las muestras analizadas. La composición elemental presenta un bajo contenido de carbono para el bagazo de caña, en comparación con los residuos de aceite de palma. En ese sentido, existe una mejor relación carbono nitrógeno de Raquis y POME en comparación con el bagazo, determinando que el déficit nutricional de este compuesto en los residuos de palma es menor. Los compuestos proteicos contenidos en el material lignocelulósico con una fuente de carbono disponible de

fácil asimilación, infiriendo que, a mayor contenido de proteína por kilo, mayor producción de biogás se tendría, toda vez que estos compuestos son la fuente de carbono en la etapa de hidrólisis de la digestión anaerobia. El POME, con su composición líquida y siendo un residuo propio de la molienda y extracción de aceite directa del fruto de palma, contiene lípidos y proteínas arrastrados por el vapor y compresión del fruto. Es así como el contenido de celulosa es aproximadamente cuatro veces menos comparado con el Raquis y 2 veces menos que el del Bagazo. Sobresale que, debido al bajo contenido de sólidos del POME, su composición de hemicelulosa, celulosa esté disuelta, generando mayor capacidad de digestión anaerobia. En todos los sustratos la proporción de cenizas y sólidos totales tienen correspondencia, teniendo el bagazo con el mayor contenido de cenizas debido a ser la fibra estructural de la planta, mientras que el Raquis hace parte del racimo frutal y el POME un subproducto del extirpado de fruto.

Los residuos del cultivo de palma de aceite en el norte del país, a diferencia mundial no presentan problemas en su balance nutricional C/N respecto a lo reportado en Indonesia, Tailandia y Malasia para el caso del raquis, en donde la relación C:N puede llegar a estar del orden de hasta 175.2 : 1 (Chang, 2014; Chaikitkaew and Kongjan, 2015). Por otro lado, la relación C/N del bagazo posee el mismo déficit de nitrógeno reportado en todas las variedades de caña de azúcar, lo cual puede influir negativamente en el funcionamiento de la comunidad microbiana que hace parte de la digestión (Bhadha *et al.*, 2020). Esto se traduce en una influencia directa en la capacidad de producir enzimas que son necesarias para la utilización del carbono, causando una conversión incompleta del sustrato y menores rendimientos de metano. El POME por su parte es un residuo rico en carbono, que debido a las condiciones en las que se genera, sus problemas de inhibición se asocian más a la acidez y generación de compuestos recalcitrantes que requieren un ajuste o codigestión como alternativa de tratamiento (Chan, Lee and Selvarajoo, 2021).

Tabla 3.6 Análisis fisicoquímico del sustrato

Muestra	Composición (%)					C/N	Balance de análisis elemental %	Cenizas %
	N	C	H	S	O			
Bagazo	0.66	42.03	5.12	-	42.52	63.7:1	90.3	9.01
Raquis	1.47	46.52	5.38	-	40.34	31.65:1	93.7	7.35
POME	2.24	36.48	6.03	-	45.22	16.29:1	89.97	9.40

Muestra	Proteína (g/kg)	Lignina (g/kg)	Celulosa (g/kg)	Hemicelulosa. (g/kg)
Bagazo	69.66	347.70	185.40	285.00
Raquis	58.38	181.60	331.20	328.60
POME	101.19	206.80	79.80	244.20

	% Sólidos Volátiles (p/p)	% Sólidos Totales (p/p)
Bagazo	82.63	90.85
Raquis	56.28	60.20
POME	6.10	7.55

La estructura del raquis y el bagazo se debe a la combinación de lignina y hemicelulosa que proporciona una vaina protectora alrededor de la celulosa. Además, la lignina no es atacada por enzimas fácilmente y protege la celulosa durante la hidrólisis, por lo tanto, mayores contenidos de lignina implican mayor dificultad en la degradación microbiana del raquis y el bagazo en comparación con el POME (Yuan *et al.*, 2021). El raquis, aunque tiene sus características balanceadas en Colombia para un buen aprovechamiento, posee una alta cantidad de lignina, lo que dificulta su digestión y por tanto su potencial de biometano. Una alternativa a esta inhibición, puede ser la incorporación de este residuo en una cadena de valor de aprovechamiento, en donde primero se extraiga la lignina para su valorización y posteriormente se utilice el residuo lignocelulósico restante como sustrato para la producción de energía (Amin *et al.*, 2017).

3.3.2 Evaluación de fuentes de carbono por parte de BFN

La figura 3.3 presenta la cuantificación del peso seco del consorcio microbiano, tanto para el ácido acético y la celulosa como fuentes de carbono. Durante los 20 días de experimento, se tuvo un aumento promedio peso seco del consorcio BFN de un 21% para la celulosa y de un 15% para el ácido acético. Entre el día 5 y 6 hay un ligero aumento en el crecimiento celular en términos de la variable cuantificada, y posteriormente se tiende a estabilizar la curva, tendiendo a tener una pendiente igual a cero, lo que podría estar asociado a la detención del crecimiento celular.

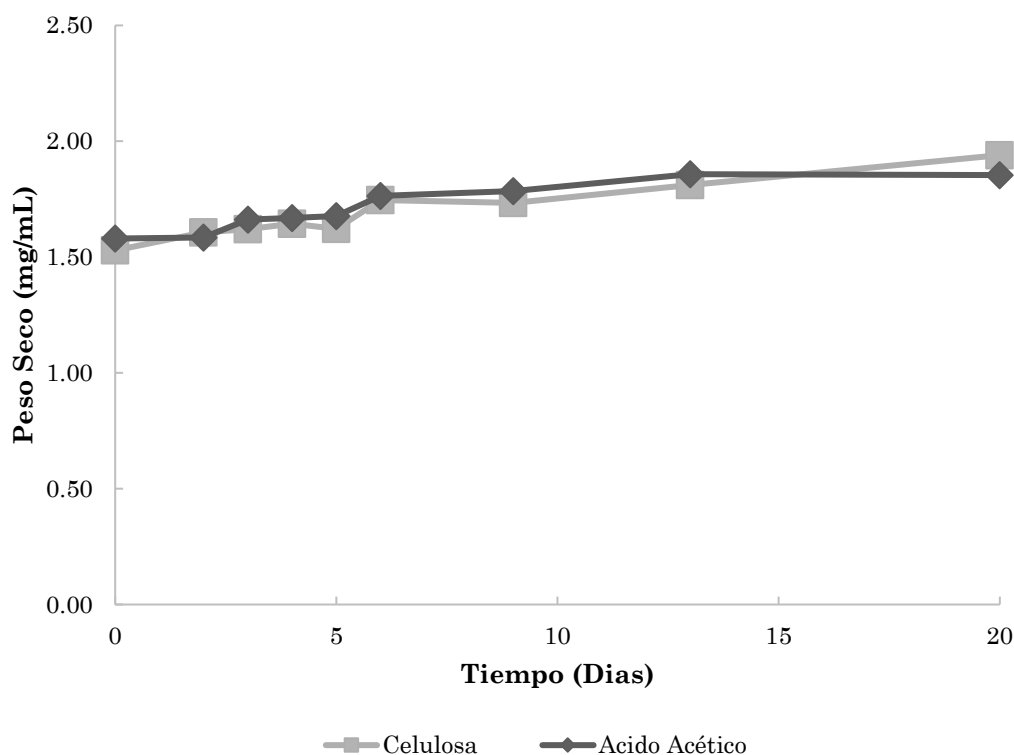


Figura 8 Comportamiento promedio del peso seco (mg/mL) del consorcio BFN usando celulosa como fuente de carbono (Cuadros en naranja) y Ácido Acético (Rombos en azul) en medio RBA. Líneas representan solamente una tendencia entre datos

La determinación de la biomasa a partir de una curva de crecimiento permite establecer la tasa de consumo de microorganismos en un proceso biológico. A partir de los resultados obtenidos se obtuvo que el consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno es capaz de utilizar más eficientemente la celulosa que el ácido acético en términos del crecimiento celular. Dado que el consorcio BFN con celulosa produjo un 6% más de biomasa que el consorcio BFN con ácido acético como fuente de carbono durante el experimento. No obstante, la posible generación de metabolitos secundarios de interés ambiental y biotecnológico, como lo son las auxinas, dan un nuevo enfoque relacionado a la importancia de la funcionalidad del consorcio en términos de producción de celulasas e incluso enzimas xilanolíticas.

El consumo de las fuentes de carbono (figura 3.4) tiene una tendencia similar para el caso de la celulosa, en donde entre el día 5 y 6 hay una disminución de la concentración de esta, tendiendo a estabilizarse. Se infiere que posterior a los 6 días, las bacterias celulolíticas alcanzaron su máximo crecimiento, teniendo en cuenta las condiciones del ecosistema del experimento, como lo son temperatura, pH, tipo y concentración de nutrientes y atmosfera. Por el contrario, para el ácido acético se encuentra un aumento de materia orgánica disuelta a lo largo del experimento, con una ligera tendencia a estabilizarse a partir del día 9. Este aumento de materia orgánica se asocia al ciclo de pérdida de biomasa en el reactor debido a la inhibición por consumo de ácido acético como fuente de carbono, dejando material celular en forma de detritos disponible.

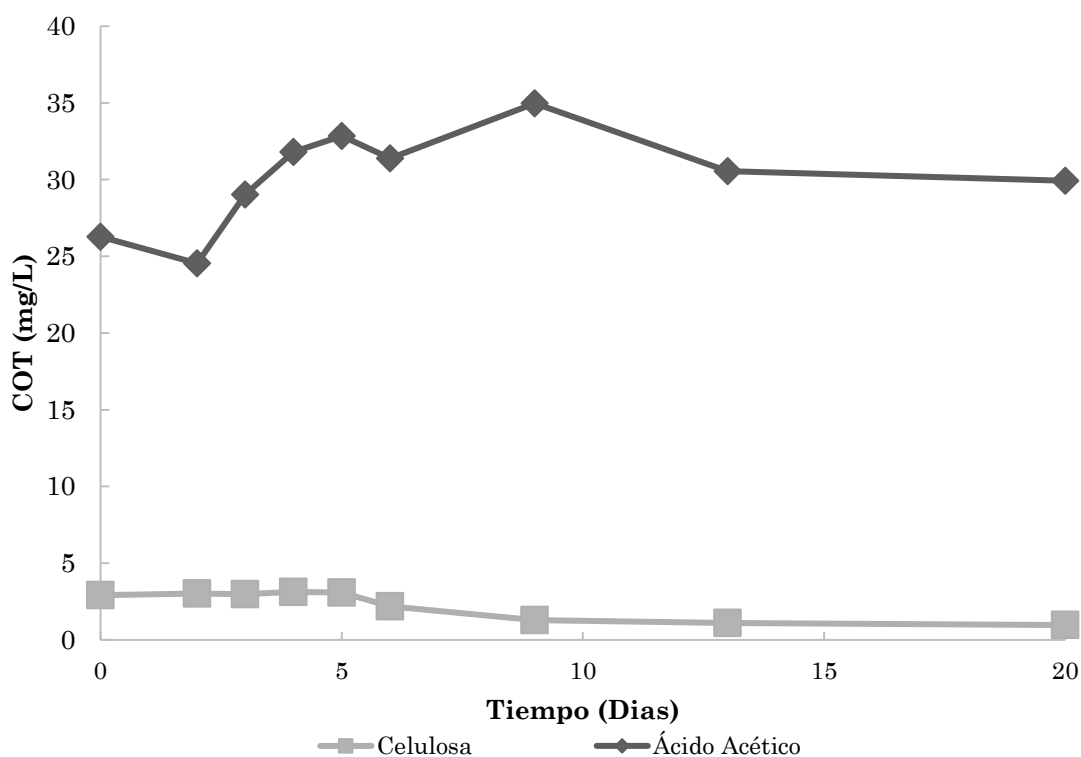


Figura 9 Comportamiento promedio del COT (mg/mL) del consorcio BFN usando celulosa como fuente de carbono (Cuadros en naranja) y Ácido Acético (Rombos en azul) en medio RBA. Líneas representan solamente una tendencia entre datos

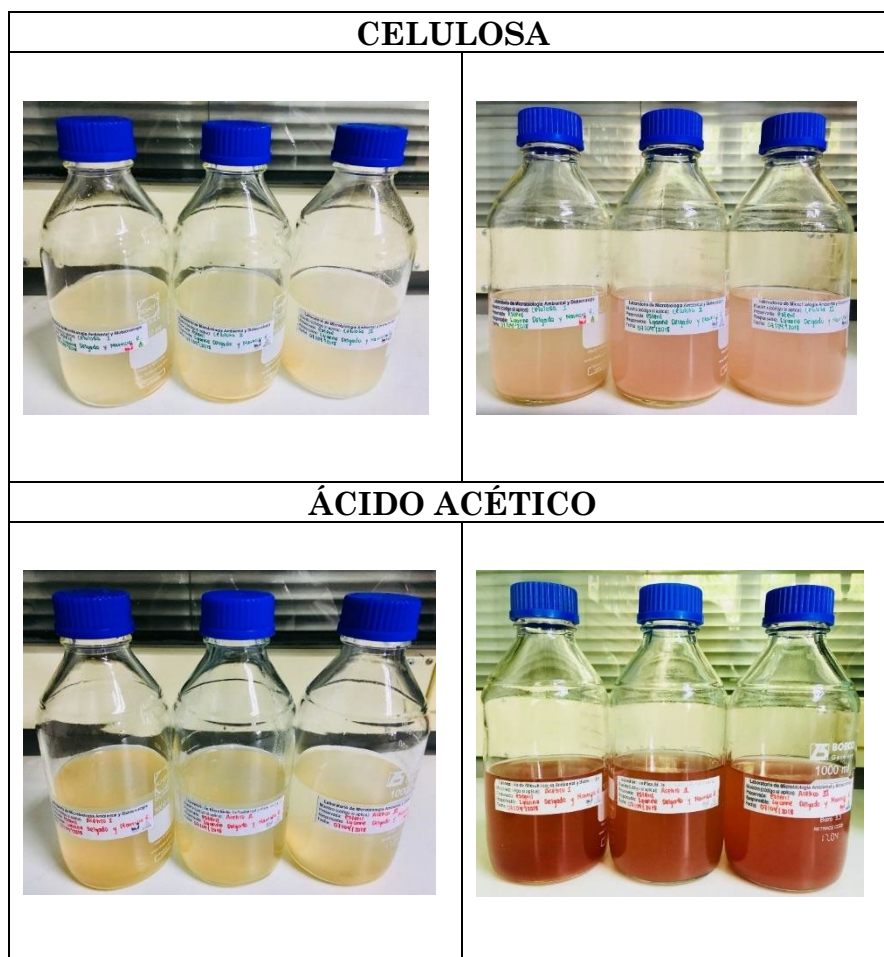


Figura 10 Comportamiento del consorcio BFN día 1 (Izquierda) y día 20 (Derecha)

La figura 3.5 presenta el experimento al inicio y final de operación, teniendo en su desarrollo la aparición de una tonalidad rosada en ambos experimentos. Esto se debió a la producción de auxinas asociadas de un grupo carboxilo y una cadena lateral acética $-CH_2$. El ácido indol-3-acético es un ácido monocarboxílico de un ácido acético en el que uno de los hidrógenos metilo ha sido sustituido por un grupo 1H-indol-3-ilo derivado del triptófano (Zhao, 2012).

La síntesis de ácido indolacético (AIA), principal auxina potencialmente presente en el consorcio por parte de bacterias fijadoras de nitrógeno está plenamente estudiado. Cultivos de cuatro cepas fijadoras de nitrógeno *Paenibacillus cineris* TP-1.4, *Bacillus megaterium* MQ-2.5, *Klebsiella pneumoniae* OM-17.2, y *Pseudomonas boreopolis* CP-18.2 produjeron hasta 93.9 mg/L de AIA con 6 días

de incubación en medio líquido con fines de promoción del crecimiento vegetal (Xa, Nghia and Tecimen, 2022). De un total de 180 cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de un cultivo de Amaranto que se sometieron a pruebas de solubilización de fósforo y de fijación de nitrógeno, se detectó que *Pseudomonas gessardi* EU-LWNA-25 y *Erwinia rhapontici* EU-B1SP1, aumentaron los parámetros de crecimiento (longitud de brotes/raíces y biomasa) y fisiológicos (contenido de clorofila, contenido total de azúcares, contenido de fenoles y flavonoides) del mismo tipo de cultivo (Devi *et al.*, 2022)

3.3.3 Determinación del potencial de producción de biogás (BMP)

En 1970, en el mundo se producía solo 2 millones de toneladas de aceite de palma, ahora es 35 veces mayor, produciéndose para 2018 un total de 71 millones de toneladas y en donde Colombia aporta 1.5 millones de toneladas al año, siendo cuatro veces más que sus competidores regionales Brasil y Ecuador (Ritchie and Roser, 2021). En promedio, una tonelada de racimos de fruta fresca procesada (FFB) de palma de aceite genera en términos de residuos un 5% de cáscara, un 12% de fibra de mesocarpio, un 23% de EFB y un 60% de POME, lo que equivale a 0.9 toneladas por racimo de fruta fresca procesada, dado que apenas un 10% del total del peso se convierte en aceite de palma (Mamimin *et al.*, 2019; Chia *et al.*, 2020).

La codigestión de residuos fortalece la posibilidad de obtener mejores desempeños en la producción de subproductos de valor agregado, balanceando el contenido nutricional y mineral, los déficit de materia orgánica y disminuyendo la inhibición por productos recalcitrantes (Lettinga *et al.*, 1997; Kasinath *et al.*, 2021; Panigrahi, Sharma and Dubey, 2022). Adaptar el inóculo a las condiciones propias del sustrato es otra perspectiva biotecnológica abordable y la combinación de inóculos una alternativa fácil y económica (van Aarle *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2018).

El bagazo de caña es un residuo lignocelulósico complejo debido a las características fisicoquímicas de las microfibrillas de la pared celular que son altamente resistentes a la hidrólisis química y biológica debido a su estructura, en la que las cadenas de celodextrinas están dispuestas con precisión. Como resultado, existe un fuerte enlace de hidrógeno entre cadenas adyacentes en una lámina de celulosa e interacciones hidrofóbicas más débiles entre hojas de celulosa, pero con la presencia de monosacáridos libres (Harmsen *et al.*, 2010). La fuerte red interconectada de enlaces de hidrógeno hace que la celulosa cristalina sea resistente a la hidrólisis enzimática. De este modo, las estructuras de orden superior a la celulosa en las plantas contribuyen a la recalcitrancia de la biomasa.

Estas características moleculares explican las limitaciones en el rendimiento en la producción de biogás cuando se usa como sustrato el bagazo ya que la compleja naturaleza heterogénea de la biomasa crea limitaciones en la degradación enzimática (Himmel *et al.*, 2007). Aunque en menores proporciones que con los residuos de palma de aceite, la lignina es uno de los principales contribuyentes a la recalcitrancia de la biomasa y una de las principales características del sustrato que afecta la conversión enzimática de la celulosa disponible en el bagazo. Debido a su revestimiento protector y naturaleza hidrófoba, la lignina retarda el acceso de la celulosa a las enzimas y a los ataques microbianos, lo que lleva a baja degradación de celulosa y hemicelulosa, traduciéndose en posibles limitaciones para la producción de biogás (Chaikitkaew, Kongjan, & O-Thong, 2015).

El residuo de caña de azúcar fue el primero de los montajes experimentales realizado en los reactores BMP-Nautilus (Figura 3.6). La mayor producción de biogas la tuvieron los montajes que incluyeron la adición de bacterias fijadoras de nitrógeno. El montaje con BFN esterilizadas obtuvo la mayor generación de biogas, mientras que el que contenía BFN activas se posicionó en segundo lugar.

Si bien la adición de materia orgánica y nutrientes como lo fue con IB + BFN_{AC} aumentó la producción de biogas, la actividad biológica de las BFN también estuvo por encima del rendimiento del bagazo de caña sin adición de BFN. El montaje con celulosa estuvo incluso por encima de los resultados del IB + Bagazo, lo que puede relacionarse a casos de inhibición o déficit de nutrientes.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si el rendimiento de biogás era diferente para la combinación de un consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno con lodos de digestión anaerobia y bagazo. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con y sin consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno para la producción de biogás con bagazo, determinando que adicionar BFN favoreció el proceso. Abordando la producción de metano del bagazo de caña, la diferencia significativa entre el tratamiento IB + BFN + Bagazo contrastado con IB + Bagazo presenta una diferencia significativa.

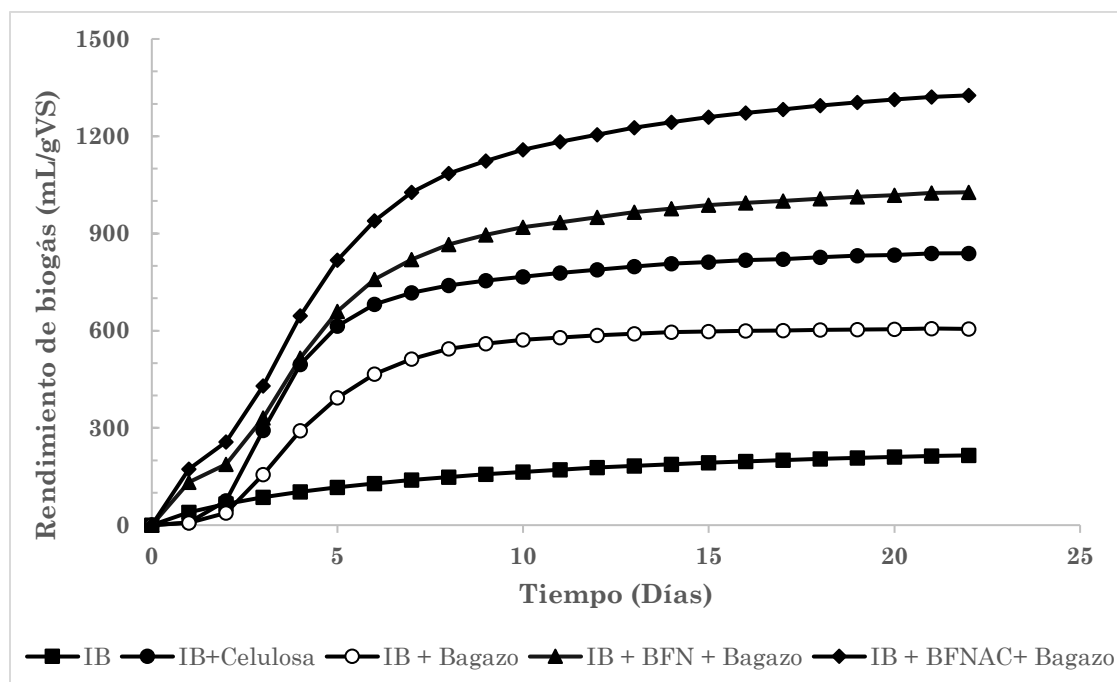


Figura 3.6 Rendimiento de producción de biogás a partir de bagazo de caña. Se muestra el rendimiento acumulado promedio de las tres réplicas realizadas para cada experimento

El Raquis de la palma de aceite no tuvo un comportamiento positivo en términos de la producción de biogas comparado con el IB + celulosa. Su contenido de azucares simples, celulosa e incluso su contenido proteico, no tuvo una biodisponibilidad debido a la composición física de la fibra en sí (Figura 3.7). Toda vez que las células vegetales de estos racimos están recubiertas de lignina y hemicelulosa de difícil degradación para la posterior liberación de las demás fuentes de carbono. En ese sentido, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si el rendimiento de biogás era diferente para la combinación de un consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno con lodos de digestión anaerobia y raquis. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con y sin consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno para la producción de biogás con raquis.

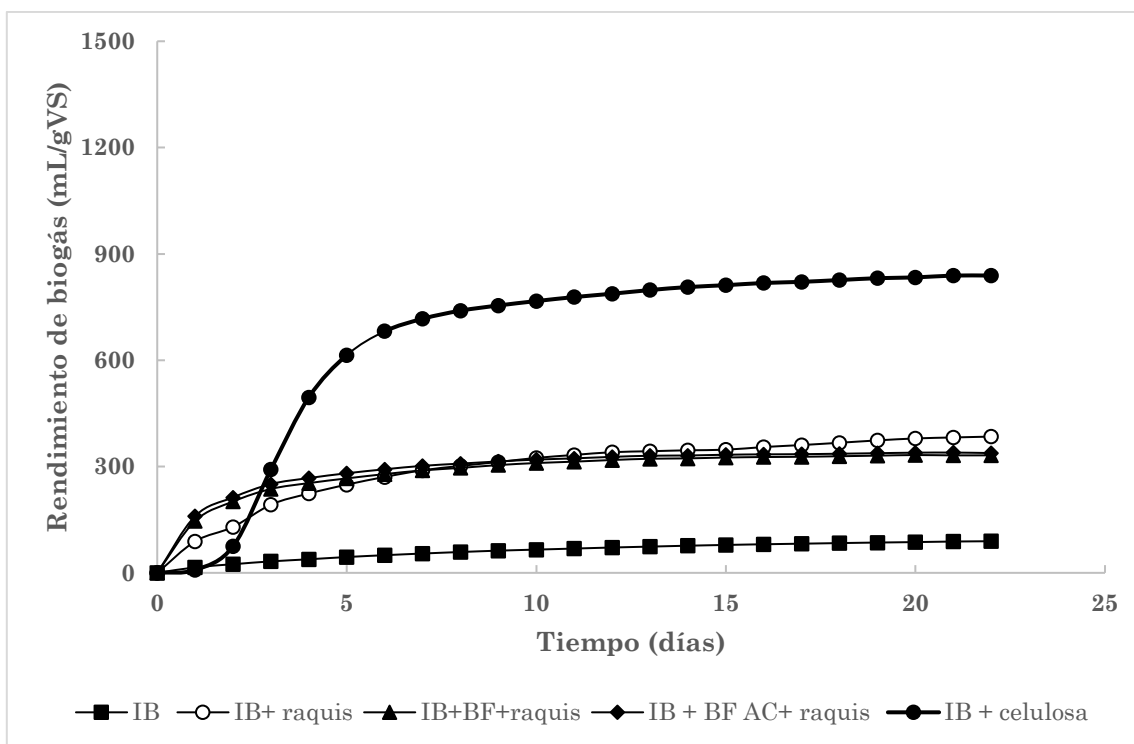


Figura 3.7 Rendimiento de producción de biogás a partir de raquis. Se muestra el rendimiento acumulado promedio de las tres replicas realizadas para cada experimento

El rendimiento de los residuos lignocelulósicos de palma de aceite puede explicarse a través de los numerosos mecanismos estructurales y químicos que la planta ha desarrollado para revestir mediante complejas estructuras fenólicas poliméricas el asalto a sus sacáridos y polisacáridos estructurales. Estos mecanismos recalcitrantes incluyen la cutícula y el tejido epidérmico, la disposición y la densidad de los haces vasculares, la cantidad relativa de esclerenquima (tejido de pared gruesa), el grado de lignificación, la heterogeneidad estructural y la complejidad de los constituyentes de la pared celular tales como microfibrillas y polímeros de matriz (Espirito Santo *et al.*, 2022).

El mayor rendimiento en cuanto a la producción de biogas lo tuvo el POME con la adición del BFN esterilizado, seguido del inóculo con POME y por último del inóculo más las bacterias fijadoras de nitrógeno activas (Ver figura 3.8). Por

último, se ubicó el inóculo más celulosa, infiriendo que el contenido de proteína, ácidos orgánicos, lípidos y azúcares propios del POME, son de mayor degradabilidad que la celulosa o hemicelulosa en este caso. Al agregar materia orgánica celular esterilizada, se generó una mayor cantidad de nutrientes y fuentes de carbono disponibles, prevaleciendo el consumo de estos con respecto a la celulosa o hemicelulosa de mayor complejidad de degradación.

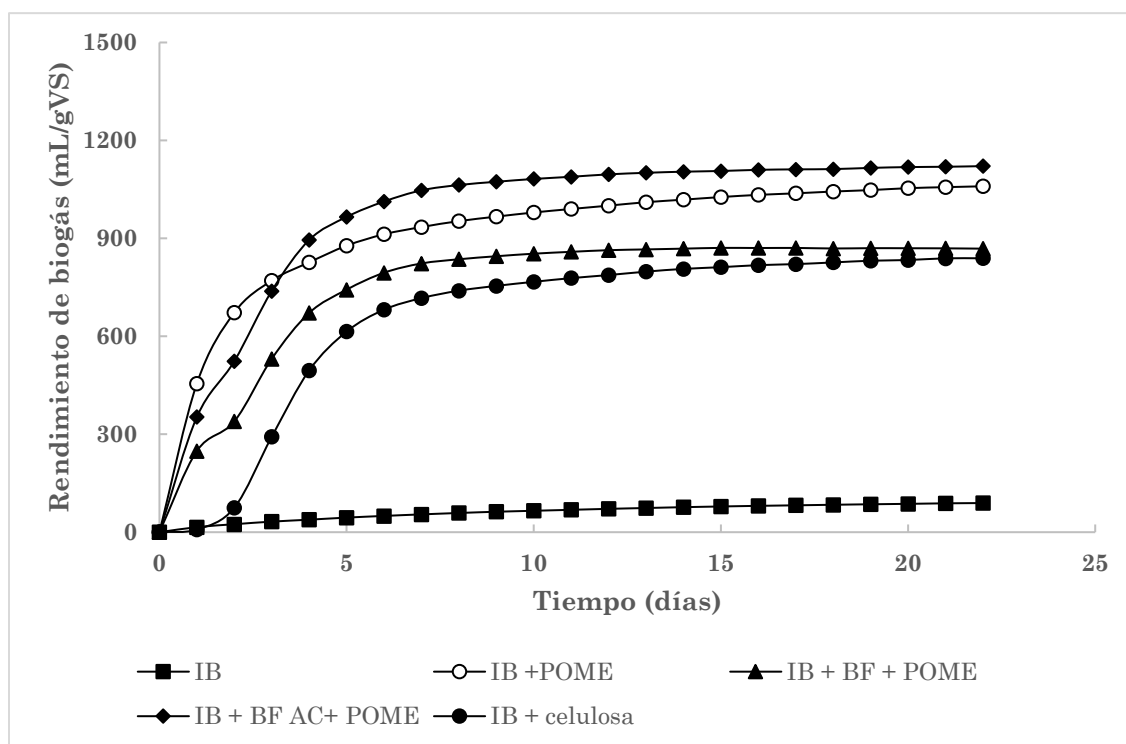


Figura 3.8 Rendimiento de producción de biogás a partir de POME. Se muestra el rendimiento acumulado promedio de las tres replicas realizadas para cada experimento

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si el rendimiento de biogás era diferente para la combinación de un consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno con lodos de digestión anaerobia y POME. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con y sin

consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno para la producción de biogás con raquis.

La tabla 3.3 presenta la producción de metano en los experimentos de interés en la actividad biológica y se muestran los valores de potencial de biogás y los porcentajes de CH₄ y CO₂ producidos en cada tratamiento:

Tabla 3.7 Potencial de biogás y porcentaje de gases obtenido en cada uno de los tratamientos

Sustrato	Potencial de Biogás (mL/ gVS)	BMP (mL _{CH₄} / gVS)	%CH ₄
IB + Bagazo	606.79± 15.38	364.92 ± 5.21	60.14 ± 1.43
IB + BFN + Bagazo	1027.05 ± 9.59	633.90 ± 48.43	61.72 ± 7.64
IB + Raquis	384.47 ± 11.82	311.42 ± 0.06	81.00 ± 0.02
IB + BFN + Raquis	331.50 ± 1.18	259.07 ± 0.88	78.15 ± 0.34
IB + POME	1122.73 ± 18.21	785.91 ± 39.25	70.00 ± 5.00
IB + BFN + POME	870.699 ± 3.33	627.77 ± 2.65	72.10 ± 4.22

Para el bagazo de caña, hubo un 57.5% más de biogás producido entre IB + Bagazo y IB + BFN + Bagazo. Es te resultado estuvo determinado por la incidencia de la interacción de BFN en los mecanismos bioquímicos sustrato/inóculo durante el proceso de producción de metano y las etapas previas en la digestión anaerobia. El porcentaje de metano del biogas es similar al reportado por estudios realizados bajo condiciones tropicales (Sao Paulo-Brasil con un 62%) y superior al encontrado en condiciones con estaciones climáticas definidas (MacKay, Australia con un 53.9%) (Janke *et al.*, 2014; Paulose and Kaparaju, 2021). Esto sumado que la cantidad de biogas IB + Bagazo generó una concentración similar a estudios realizados a diferentes residuos lignocelulósicos, en donde el bagazo de caña obtuvo 376 mLCH₄/gVS (Buitrón, *et al.*, 2019). Igualmente, valores similares a bagazos tratados con hidrolisis enzimática previamente, en donde su máximo contenido de biogás fue de 378.65 mLCH₄/gVS (Zhao, *et. al.*, 2021).

Según los datos reportados en varios artículos, el contenido de metano del biogás producido a partir de POME se encuentra entre el 55-75% lo que lo convierte en un residuo adecuado para la producción de combustible y gas natural a partir de digestión anaerobia (Firdaus *et al.*, 2017; Chan, Lee and Selvarajoo, 2021). Los resultados obtenidos para este residuo coinciden con los datos teóricos. Dado que la degradación de material orgánico produce biogás, cuyo volumen depende de la degradación de sólidos volátiles presente en cada sustrato y de los nutrientes disponibles en el medio. Se observó que el enriquecimiento de los medios de digestión con aumento en la producción de biogás en el POME y el bagazo, a pesar de que en POME hubiese estado esterilizado.

Dado el volumen de residuo generado y que es líquido, el POME es el más estudiado de los residuos de la industria de palma de aceite. Las investigaciones llevadas a cabo para la producción de biogás con este compuesto, se centran en tasas de dilución, concentración inóculo sustrato y codigestión. Un estudio llevado a cabo en Malasia durante 30 días, obtuvo hasta 1500 mL/ gVS con POME como sustrato, teniendo una relación inóculo: sustrato de 60% a 40% (Noor Khaleeda Mhd Syahri *et al.*, 2022). Los montajes de la presente investigación alcanzaron hasta 1122.73 mL/gVS en apenas las dos terceras partes del tiempo empleado. Con resultados promisorios, es viable pensar en evaluar la concentración del sustrato con respecto al inóculo. En Tailandia, se valoró la dilución de POME para la producción de biogas, demostrando que diluir en un 80% el POME puede lograr hasta 2000 mg CH₄/L en 35 días (Sangsri *et al.*, 2021). Según los datos reportados en varios artículos, el contenido de metano del biogás producido a partir de POME se encuentra entre el 55-75% lo que lo convierte en un residuo adecuado para la producción de combustible y gas natural a partir de digestión anaerobia, aproximándose los resultados de este experimento a lo reportado por la bibliografía (Firdaus, Prasetyo, Sofyan, & Siregar, 2017).

Si bien esta investigación aborda la evaluación del POME para la producción de biogás, no se debe dejar a un lado que este compuesto es un agua residual de un proceso productivo y que la meta antes del aprovechamiento de sus subproductos, es disminuir el impacto ambiental. Para disminuir la emisión de aguas residuales a los cuerpos hídricos, el POME se usa como fertilizante de los propios suelos de cultivo. Asociado a la lámina de riego del cultivo y disminuyendo la fertilización química, se pueden aumentar hasta en un 13% la cantidad de racimos por palma usando el POME como fertilizante. Todo esto sin inversiones o desarrollos tecnológicos para la implementación de sistemas de producción de metano y su transformación en energía. No obstante, es de resaltar que un molino de aceite de palma con una capacidad de 45 toneladas de racimos de fruta vacíos por hora puede generar entre 0,95 y 1,52 MW de electricidad. La combinación del digestor de biogás basado en POME y la codigestión de raquis puede añadir otros 0,93 MW (Hasanudin *et al.*, 2015).

A nivel molecular, los efluentes de la extractora de aceite de palma (POME) poseen un mayor contenido azúcares simples como arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa, manosa, y materiales celulósicos que contienen el aceite del fruto (Chan, Lee and Selvarajoo, 2021). Sin embargo, según los sólidos volátiles, el raquis pudo potencialmente aportar mayor cantidad de materia orgánica a la digestión anaerobia. Uno de los factores que pudo incidir drásticamente en los resultados fue la composición física de las fibras de raquis. La lignina de limitada degradación procariota, funciona como un revestimiento protector para mantener una estructura rígida en las plantas; por lo tanto, abrir su estructura compacta aumenta la biodegradabilidad (Taherzadeh and Karimi, 2008). Es así como, se hace necesaria la deslignificación para la liberación de celulosa y hemicelulosa con el fin de lograr una eficiente digestión anaerobia del raquis. Además, la ruptura de los enlaces celulosa-hemicelulosa-lignina también puede ayudar a obtener mayores rendimientos de azúcares reductores, en donde desde una perspectiva de biorrefinería, la lignina y otros subproductos se pueden

aprovechar (Chia *et al.*, 2020). Por otro lado, requerir un pretratamiento significa necesitar un input de energía adicional, el cual normalmente es alto, por lo que la viabilidad de pretratar residuos de raquis para generar biogás demanda una evaluación de factibilidad técnico-económica detallada.

3.4 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la determinación del potencial de biogás de los sustratos evaluados se evidenció que, la combinación de consorcios fijadores de nitrógeno tiene un efecto positivo en la producción de biogás en el bagazo de caña. Aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas en los residuos de palma de aceite, es viable explorar la relación sustrato/inóculo y para concluir si realmente hay o no, diferencias entre adicionar BFN a la digestión anaerobia. Para todos los montajes la producción acumulada de biogás se empezó a estabilizar a partir del día 10, lo que en términos de un proceso en batch podría significar la evaluación de la pertinencia de tener los ciclos de fermentación hasta dicho día y la ampliación

Los resultados de producción de biogás de los tratamientos con el consorcio de microorganismos fijadores de nitrógeno, permite evidenciar que la actividad enzimática del consorcio influye positivamente en la producción de un biogás. La determinación de las interacciones microbianas de combinar los dos ecosistemas biológicos y explorar incluso otro tipo de inóculos fijadores de nitrógeno brinda una línea de investigación adicional.

A partir del rendimiento de biogás obtenido, es viable pensar en alguna tecnología de pretratamiento que contribuya a hidrolizar los compuestos lignocelulósicos.

3.5 Bibliografía

Achinas, S., Achinas, V. and Euverink, G. J. W. (2017) 'A Technological Overview of Biogas Production from Biowaste', *Engineering*. Elsevier, 3(3), pp. 299–307. doi: 10.1016/J.ENG.2017.03.002.

Aguiar, A. *et al.* (2021) 'Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications', *Biomass and Bioenergy*. Pergamon, 144, p. 105896. doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2020.105896.

Amin, F. R. *et al.* (2017) 'Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion', *AMB Express*. Springer, 7(1). doi: 10.1186/S13568-017-0375-4.

Anukam, U. S. *et al.* (2020) 'Isolation of High Lignolytic Bacteria from Termites's Gut as Potential Booster in for Enhanced Biogas Production', *Biotechnology Journal International*. Sciencedomain International, 24(3), pp. 19–23. doi: 10.9734/BJI/2020/V24I330104.

Becerra Quiroz, A. P., Buitrago Coca, A. L. and Pinto Baquero, P. (2016) 'Sostenibilidad del aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar en el Valle del Cauca, Colombia', *Ingeniería solidaria*, 12(20), p. 133. doi: 10.16925/in.v12i20.1548.

Bhadha, J. H. *et al.* (2020) 'Bagasse: A Potential Organic Soil Amendment Used in Sugarcane Production', *EDIS*. University of Florida George A Smathers Libraries, 2020(5), p. 5. doi: 10.32473/EDIS-SS690-2020.

Chaikitkaew, S. and Kongjan, P. (2015) 'Biogas Production from Biomass Residues of Palm Oil Mill by Solid State Anaerobic Digestion', *Energy Procedia*. Elsevier, 79, pp. 838–844. doi: 10.1016/J.EGYPRO.2015.11.575.

Chan, Y. J., Lee, H. W. and Selvarajoo, A. (2021) 'Comparative study of the synergistic effect of decanter cake (DC) and empty fruit bunch (EFB) as the co-substrates in the anaerobic co-digestion (ACD) of palm oil mill effluent (POME)', *Environmental Challenges*. Elsevier, 5, p. 100257. doi: 10.1016/J.ENVC.2021.100257.

Chang, S. H. (2014) 'An overview of empty fruit bunch from oil palm as feedstock for bio-oil production', *Biomass and Bioenergy*, 62, pp. 174–181. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.01.002.

Chia, W. Y. *et al.* (2020) 'Outlook on biorefinery potential of palm oil mill effluent for resource recovery', *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Elsevier, 8(6), p. 104519. doi: 10.1016/J.JECE.2020.104519.

Deshavath, N. N., Veeranki, V. D. and Goud, V. V. (2019) 'Lignocellulosic feedstocks for the production of bioethanol: availability, structure, and composition', *Sustainable Bioenergy: Advances and Impacts*. Elsevier, pp. 1–19. doi: 10.1016/B978-0-12-817654-2.00001-0.

Devi, R. *et al.* (2022) 'Microbial consortium of mineral solubilizing and nitrogen fixing bacteria for plant growth promotion of amaranth (*Amaranthus hypochondrius* L.)', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier, 43, p. 102404. doi: 10.1016/J.BCAB.2022.102404.

Espirito Santo, M. C. *et al.* (2022) 'Leaves from four different sugarcane varieties as potential renewable feedstocks for second-generation ethanol production: Pretreatments, chemical composition, physical structure, and enzymatic hydrolysis yields', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier, 45, p. 102485. doi: 10.1016/J.BCAB.2022.102485.

Firdaus, N. *et al.* (2017) 'Part II of II: Palm Oil Mill Effluent (POME): Biogas Power Plant', <http://dx.doi.org/10.1080/21563306.2017.11878943>. Association of Energy Engineers (AEE), 32(3), pp. 6–18. doi: 10.1080/21563306.2017.11878943.

Harindintwali, J. D. *et al.* (2022) 'Harnessing the power of cellulolytic nitrogen-fixing bacteria for biovalorization of lignocellulosic biomass', *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 186, p. 115235. doi: 10.1016/J.INDCROP.2022.115235.

Harirchi, S. *et al.* (2022) 'Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review', <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986>. Taylor & Francis, 13(3), pp. 6521–6557. doi: 10.1080/21655979.2022.2035986.

Harmsen, P. *et al.* (2010) 'Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass'.

Hasanudin, U. *et al.* (2015) 'Palm oil mill effluent treatment and utilization to ensure the sustainability of palm oil industries', *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*. Water Sci Technol, 72(7), pp. 1089–1095. doi: 10.2166/WST.2015.311.

Himmel, H.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315 (5813), 804–807. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137016>.

IPCC (2019) *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*.

Janke, L. *et al.* (2015) 'Biogas Production from Sugarcane Waste: Assessment on Kinetic Challenges for Process Designing', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 16(9), pp. 20685–20703. doi: 10.3390/ijms160920685.

Jiang, Y. *et al.* (2019) 'Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: A critical review', *Journal of Water Process Engineering*. Elsevier, 32, p. 100899. doi: 10.1016/J.JWPE.2019.100899.

Kasinath, A. *et al.* (2021) 'Biomass in biogas production: Pretreatment and codigestion', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, 150, p. 111509. doi: 10.1016/J.RSER.2021.111509.

Lee, M. *et al.* (2020) 'Environmental and energy assessment of biomass residues to biochar as fuel: A brief review with recommendations for future bioenergy systems', *Journal of Cleaner Production*. Elsevier, 251, p. 119714. doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2019.119714.

Lettinga, G. *et al.* (1997) 'Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future', *Water Science and Technology*. No longer published by Elsevier, 35(10), pp. 5–12. doi: 10.1016/S0273-1223(97)00222-9.

Mamimin, C. *et al.* (2019) 'Enhancement of biohythane production from solid waste by co-digestion with palm oil mill effluent in two-stage thermophilic fermentation', *International Journal of Hydrogen Energy*. Pergamon, 44(32), pp. 17224–17237. doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2019.03.275.

Mankar, A. R. *et al.* (2021) 'Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances', *Bioresource Technology*. Elsevier, 334, p. 125235. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.125235.

Nasir, S. *et al.* (2019) 'Potential valorization of by-product materials from oil palm: A review of alternative and sustainable carbon sources for carbon-based nanomaterials synthesis', *BioResources*. North Carolina State University, 14(1), pp. 2352–2388. doi: 10.15376/BIORES.14.1.NASIR.

Noor Khaleeda Mhd Syahri, S. *et al.* (2022) 'Biogas Production Under Different Inoculum to Palm Oil Mill Effluent Ratio', *Jurnal Kejuruteraan*, 34(6), pp. 1265–1269. doi: 10.17576/jkukm-2022-34(6)-26.

Okolie, J. A. *et al.* (2022) 'Waste biomass valorization for the production of biofuels and value-added products: A comprehensive review of thermochemical, biological and integrated processes', *Process Safety and Environmental Protection*. Elsevier, 159, pp. 323–344. doi: 10.1016/J.PSEP.2021.12.049.

Panigrahi, S., Sharma, H. B. and Dubey, B. K. (2022) 'Optimization of F/M Ratio During Anaerobic Codigestion of Yard Waste with Food Waste: Biogas Production and System Stability', *Treatment and Disposal of Solid and Hazardous Wastes*. Springer, Cham, pp. 185–192. doi: 10.1007/978-3-030-29643-8_9.

Pelaez, R. D. R. *et al.* (2022) 'Biotechnological valorization of lignocellulosic residues from the oil palm industry: status and perspectives', *Biomass Conversion and Biorefinery 2022*. Springer, pp. 1–23. doi: 10.1007/S13399-022-02637-4.

Raja, R. *et al.* (2008) 'A perspective on the biotechnological potential of microalgae.', *Critical reviews in microbiology*, 34(2), pp. 77–88. doi: 10.1080/10408410802086783.

Sangsri, S. *et al.* (2021) 'Evaluating Biomethane Potential of Inocula from Different Active Biogas Digesters for Palm Oil Mill Effluent by BMP and SMA: Effect of Dilution and Sources', *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 18(1), p. Article 6515 (12 pages). doi: 10.48048/wjst.2021.6515.

Sun, L. *et al.* (2018) 'A novel membrane bioreactor inoculated with symbiotic sludge bacteria and algae: Performance and microbial community analysis', *Bioresource Technology*. Elsevier, 251, pp. 311–319. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2017.12.048.

Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. (2008) *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*, *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms9091621.

Tsegaye, B., Balomajumder, C. and Roy, P. (2019) 'Isolation and Characterization of Novel Lignolytic, Cellulolytic, and Hemicellulolytic Bacteria from Wood-Feeding Termite *Cryptotermes brevis*', *International Microbiology*. Springer, 22(1), pp. 29–39. doi: 10.1007/S10123-018-0024-Z/METRICS.

Uçkun Kiran, E. *et al.* (2016) 'Production of biogas via anaerobic digestion', *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies: Second Edition*. Woodhead Publishing, pp. 259–301. doi: 10.1016/B978-0-08-100455-5.00010-2.

UPME (2015) *Plan energético nacional de Colombia: Ideario energético 2050*. Edited by REPÚBLICA DE COLOMBIA Ministerio de Minas y Energía Contenido. Bogotá.

Usman Khan, M. and Kiaer Ahring, B. (2021) 'Improving the biogas yield of manure: Effect of pretreatment on anaerobic digestion of the recalcitrant fraction of manure', *Bioresource Technology*. Elsevier, 321, p. 124427. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2020.124427.

van Aarle, I. M., Perimenis, A., Lima-Ramos, J., de Hults, E., George, I. F., & Gerin, P. A. (2015). Mixed inoculum origin and lignocellulosic substrate type both influence the production of volatile fatty acids during acidogenic fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 242–249. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2015.07.016>

Vasco-Correa, J. *et al.* (2018) 'Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental

and techno-economic implications, and government policies', *Bioresource Technology*. Elsevier, 247, pp. 1015–1026. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2017.09.004.

Wang, W., Chang, J. S. and Lee, D. J. (2023) 'Anaerobic digestate valorization beyond agricultural application: Current status and prospects', *Bioresource Technology*. Elsevier, 373, p. 128742. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2023.128742.

Xa, L. T., Nghia, N. K. and Tecimen, H. B. (2022) 'Environmental Factors Modulating Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis by Four Nitrogen Fixing Bacteria in a Liquid Culture Medium', *Environment and Natural Resources Journal*. Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, 20(3), pp. 279–287. doi: 10.32526/ENNRJ/20/202100233.

Yuan, Y. *et al.* (2021) 'Recent advances in understanding the effects of lignin structural characteristics on enzymatic hydrolysis', *Biotechnology for Biofuels* 2021 14:1. BioMed Central, 14(1), pp. 1–20. doi: 10.1186/S13068-021-02054-1.

Yue, F. *et al.* (2016) 'Structural Modifications of Sugarcane Bagasse Lignins during Wet-storage and Soda-oxygen Pulping Structural Modifications of Sugarcane Bagasse Lignins during Wet-storage and Faculty of Chemical Engineering , Kunming University of Science and Technology St'. doi: 10.1021/acssuschemeng.6b00726.

Zhao, Y. (2012) 'Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants', *Molecular Plant*. Cell Press, 5(2), pp. 334–338. doi: 10.1093/MP/SSR104.

CAPITULO IV EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA NITRÓGENADA USANDO CONSORCIOS MICROBIANOS DE DIAZÓTROFOS

4.1. Introducción

En la actualidad, la humanidad tiene como desafío global alcanzar para el año 2030 los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible -ODS de las Naciones Unidas. Aunque los ODS están integrados y asociados entre sí, un total de 6 ODS demandan prácticas de producción, distribución y consumo de alimentos más sostenibles (2-Hambre cero; 3-Salud y bienestar; 12-Producción y consumo responsable; 13-Acción por el clima; Vida Submarina y 15-Vida en ecosistemas terrestres). La fertilización química nitrogenada -FQN ha sido determinante en la agricultura y en el sostenimiento de la demanda global de alimentos (Stevens, 2019). Sin embargo, la extensiva aplicación de fertilizantes nitrogenados ha tenido un considerable impacto ambiental desde su producción industrial hasta su uso en cultivos (Myrold, 2021). En promedio un 40% de los fertilizantes utilizados es realmente aprovechado por las plantas y el porcentaje restante se pierde a la atmósfera por evaporación o denitrificación producto de la irrigación, lixiviación, escorrentía o las lluvias, estos compuestos pueden llegar a acuíferos, ríos y lagos, generando eutrofización y alteración de ecosistemas hipóxicos (Elrys et al., 2019; Mahmud et al., 2021).

Desde su descubrimiento a finales del siglo XIX, la biofertilización nitrogenada a partir de diazótrofos ha sido empleada en diversos tipos de cultivo como sustituto a las técnicas convencionales de FQN (Sansinenea, 2021). Se conocen alrededor de 17 géneros con la capacidad de establecer simbiosis con leguminosas, el género *Frankia* con plantas actinorrícicas y asociación de cianobacterias con algunas briófitas, cícadas y eudicotas basales (Mus et al., 2016; 'Plant Microbe Symbiosis', 2020). El uso de bacterias asimbióticas podría ser ventajoso en tanto que no son específicas a la interacción con plantas

específicas. Generalmente, las aplicaciones en suelo se han concentrado a especies del género *Azotobacter* y *Azospirillum* y recientemente se ha despertado un interés en la evaluación de bacterias de géneros como *Bacillus*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella* (Liu et al., 2020; Mukherjee et al., 2020; Ogugua et al., 2018). Con el desarrollo de las ciencias ómicas se ha incrementado la descripción de nuevas especies fijadoras de nitrógeno, así como las diversas asociaciones ecológicas (Dellagi et al., 2020; Kannepalli et al., 2020). Así mismo, las técnicas de bioaumentación y enriquecimiento bajo condiciones controladas en bioreactores, favorecen rutas y asociaciones metabólicas específicas, seleccionando microorganismos y dando como resultado consorcios microbianos especializados con utilidad biotecnológica (Gutiérrez et al., 2022; Said & Or, 2017; Zhang et al., 2018).

Por otro lado, las comunidades microbianas en el suelo o la rizosfera contribuyen al crecimiento de las plantas al reciclar nutrientes y ponerlos a disposición (Mendes et al., 2013). Diversas interacciones microbianas son responsables de los procesos ambientales clave, como el ciclo biogeoquímico de nutrientes y materia, el mantenimiento de la salud de las plantas y la calidad del suelo. Existen varios grupos de microorganismos beneficiosos de la rizosfera. Las bacterias que proporcionan beneficios a la planta forman relaciones simbióticas con la planta o viven libremente en el suelo y se encuentran cerca o incluso dentro de las raíces (Carrión et al., 2019).

A nivel global, anualmente se producen alrededor de 32.5 millones toneladas de Ají (*Capsicum annuum*) siendo China y México los mayores productores, en un mercado con crecimiento anual del 8% y con una participación de Colombia con cerca de 29,900 Ton/año (MinCIT, 2013; Mongkolporn, 2018). No obstante, este cultivo demanda concentraciones específicas tanto de nutrientes como micronutrientes con el fin de garantizar características específicas tanto en el fenotipo como de cada variedad (Pinto et al., 2016). El ají, al ser un ingrediente

de muchos alimentos a nivel mundial demanda prácticas de cultivo ambientalmente sostenibles y una reducción del uso de agroquímicos. El uso de biofertilizantes en este cultivo se ha desarrollado principalmente en la disminución o reemplazo de las concentraciones de nitrógeno y fósforo usando cepas puras de microorganismos (Amaresan et al., 2012; Jiménez-Leyva et al., 2017; Zaidi et al., 2015). El estudio de consorcios microbianos fijadores de nitrógeno no específicos no ha sido llevado a cabo hasta ahora en el cultivo de ají. Es por esto que el desarrollo de consorcios microbianos puede mejorar el crecimiento de las plantas y el rendimiento del cultivo e igualmente contribuiría a reducir la aplicación de fertilizantes químicos al suelo.

En orden de disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de ají Cayena (*Capsicum annuum* L. cv. Cayena), un experimento en campo fue llevado a cabo. El objetivo principal fue la sustitución de nitrógeno químico en el plan de nutrición de la planta por un consorcio microbiano de diazótrofos previamente establecido y proveniente de un suelo de un cultivo productivo.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Suelo y planta

El experimento fue llevado a cabo en el departamento Valle del Cauca (Colombia) a una altura de 957 m.s.n.m. y con un rango de temperatura entre los 21.5°C y los 28°C. Los montajes se realizaron en materas plásticas con 6 kg de suelo. Fueron recolectadas 4 muestras de suelos de diferentes regiones cultivadoras de ají Cayena (La Unión: S₁, Palmira: S₂, Pradera: S₃ y Yotoco: S₄). Las muestras fueron tomadas con un rango de profundidad de 20 cm, tamizadas con un diámetro de poro de 2 cm con el fin de eliminar rocas. Posteriormente se almacenaron 2 kg de cada muestra para su caracterización fisicoquímica.

Se utilizaron semillas de ají (*Capsicum annuum* L. cv. Cayena) seleccionadas y estandarizadas provenientes de la industria productora y exportadora de pasta de Ají Hugo Restrepo & Cía S.A®. La germinación de las plantas de ají cayena se realizó en alveolos por un periodo de 45 días, sin ninguna clase de fertilización y posteriormente se trasplantó una planta en cada matera y se instaló un tutor para el sostenimiento de la planta durante su crecimiento. Se realizó una caracterización fisicoquímica del suelo (materia orgánica, cationes, nutrientes, pH y conductividad) antes y después del experimento. Los análisis se efectuaron siguiendo las metodologías de los métodos estandarizados (Jackson, 2005).

4.2.2. Diseño experimental

Se dispuso de un experimento factorial completamente al azar con dos factores. El primer factor fue tipo de suelo (S_1 , S_2 , S_3 y S_4). El segundo factor fue fertilización con tres fertilizaciones. La primera fertilización (F_1) fue la dosis nitrogenada convencional recomendada para el cultivo de ají (2.24 gr/planta); la segunda fertilización (F_2) fue utilizar un 2/3 (66.6%) de fertilizante nitrogenado y un 1/3 (33.3%) de un consorcio microbiano de diazótrofos y la tercera fertilización (F_3) fue 2/3 (66.6%) consorcio microbiano de diazótrofos y 1/3 (33.3%) fertilizante nitrogenado. Se tuvo un total de 12 tratamientos con 5 réplicas por tratamiento, la unidad experimental fue una planta de ají. Las plantas fueron regadas diariamente mediante un sistema de riego localizado garantizando capacidad de campo constante. Cantidad de frutos y peso fresco fueron las variables de respuesta del cultivo, para la posterior estimación de rendimiento de cultivo por hectárea de su primera cosecha, la cual se realizó a los 90 días del sembrado en materas.

ID de tratamiento	Suelo	Fertilización
T1	La Unión (S ₁)	F ₁
T2	La Unión (S ₁)	F ₂
T3	La Unión (S ₁)	F ₃
T4	Palmira (S ₂)	F ₁
T5	Palmira (S ₂)	F ₂
T6	Palmira (S ₂)	F ₃
T7	Pradera (S ₃)	F ₁
T8	Pradera (S ₃)	F ₂
T9	Pradera (S ₃)	F ₃
T10	Yocoto (S ₄)	F ₁
T11	Yocoto (S ₄)	F ₂
T12	Yocoto (S ₄)	F ₃

4.2.3. Consorcio microbiano de diazótrofos - CMD

Como primer paso, una muestra de 250 gr de un suelo proveniente de un cultivo productivo de maíz se pasó a través de un tamiz de 0.95 cm. El segundo paso fue agregar el suelo a un Erlenmeyer con 1 L de NaCl 8.5% y se agitó por 12 h (200 RPM) con el fin de desagregar sólidos, disolver materia orgánica y nutrientes propios del suelo en la solución. Posteriormente se dejó sedimentar por 40 min, se retiró el sobrenadante, se tomó el sedimentado y se repitió el segundo paso. Finalmente, el sedimentado se utilizó como inóculo en un reactor secuencial en batch (SBR) de 0.75 L (200 RPM, 30 ±2°C y aireación de 2 vvm). El sustrato del reactor consistió en medio 441 DSMZ RBA modificado, sin adición de vitaminas y con 15.6 g/L de Sacarosa, 3 g/L de Glucosa y 1.4 g/L de Manitol como fuente de carbono o solución B (DSMZ, 2007).

El reactor fue operado por 45 días previo al inicio del experimento en campo y se mantuvo estable con una concentración promedio de 1.2×10^8 UFC/mL de BFN. La concentración de diazótrofos fue cuantificada en un medio sólido de igual composición que el del reactor. Tanto a los suelos como al inóculo se le realizó cuantificación de enterobacterias con agar Eosina azul de metileno – EMB, bacterias solubilizadoras de fosfato en medio SMRS, *Pseudomonas* agar Cetrinida y bacterias mesófilas con agar nutritivo.

4.2.4. Plan de nutrición y fertilización

De acuerdo con la compañía que suministró las semillas de *Capsicum annuum* L. cv. Cayena, el plan de nutrición por hectárea recomendado para los suelos del Valle del Cauca es de 56:65:73 kg de N:P₂O₅:K₂O respectivamente. La densidad de siembra es de 25,000 plantas/Ha. Los fertilizantes fueron aplicados directamente en cada matera mezclado con la lámina de riego una vez por semana. Nitrógeno se aplicó de forma amoniacal y de nitratos, Fósforo en forma de Ácido Fosfórico diluido en agua y Potasio en forma de Sulfato de Potasio. La cantidad total de N:P₂O₅:K₂O por planta para F₁ fue de 2.33 g, 4.69 g y 4.17 g respectivamente. Para el caso de F₂ la dosis de N fue de 1.55 g y se agregó 0.33 g de CMB. Para F₃ se tuvo 0.78 g de N y 0.66 g de CMB. Todos los tratamientos contaron con 1.19 g de S, 0.42 g de MgO, 0.07 g de Br, 0.03 g de Fe, 2.91 g de CaO y 0.03 g de Zn.

4.2.5. Análisis estadístico

Para el caso de la comparación de los tipos de suelo con el tipo de tratamiento y su respectivo rendimiento los datos se sometieron al análisis de varianza - ANOVA (<0.05) y las medias se compararon mediante la técnica de rangos múltiples de Duncan. Todos los datos del estudio fueron analizados en el software SPSS XXVI IBM.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Inóculo

La tabla 4.1 muestra la composición inicial de bacterias para cada suelo e inóculo.

Tabla 4.8 Caracterización bacteriana suelos e inóculo

	CMD	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
Bacterias mesófilas (UFC/g)	1.00 X 10 ⁷	1.30 X 10 ⁷	2.80 X 10 ⁷	1.30 X 10 ⁷	1.10 X 10 ⁷
Bacterias solubilizadoras de fosforo (UFC/g)	2.70 X 10 ⁷	1.10 X 10 ⁷	1.40 X 10 ⁷	1.10 X 10 ⁷	1.60 X 10 ⁶
Enterobacterias (UFC/g)	5.80 X 10 ⁶	2.50 X 10 ⁶	2.60 X 10 ⁶	2.50 X 10 ⁶	5.50 X 10 ⁵
<i>Pseudomonas</i> (UFC/g)	6.00 X 10 ⁴	1.00 X 10 ³	1.00 X 10 ³	1.00 X 10 ³	1.00 X 10 ³
Diazótrofos (UFC/g)	1.20 X 10 ⁸	2.80 X 10 ⁶	2.05 X 10 ⁶	2.90 X 10 ⁶	2.20 X 10 ⁶

CMD: Consorcio Microbiano de Diazótrofos; S₁: La Unión; S₂: Palmira; S₃: Pradera; S₄: Yotoco.

De acuerdo con la tabla 1, los cuatro suelos tienen una composición microbiana similar, en donde sí se encuentran diferencias es en el CMD a utilizar, el cual cuenta con mayores concentraciones de diazótrofos, bacterias solubilizadoras de fósforo y pseudomonas, todas estas asociadas a las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). El uso de un consorcio microbiano como biofertilizante aporta microorganismos con diferentes grupos funcionales con diferentes capacidades como la promoción del crecimiento vegetal, solubilización de nutrientes en el suelo y el aporte de agentes de biocontrol, como algunas especies de *pseudomonas* y *bacillus* (Chauhan et al., 2015). Adicionalmente, el proceso de enriquecimiento del consorcio microbiano mantuvo las relaciones entre taxones al nivel de reino, al no eliminar protozoos, hongos, levaduras, algas, arqueas o rotíferos presentes en el inóculo, lo que podría clasificar el biofertilizante como un consorcio microbiano de “interreinos”, aportando robustez y capacidad de mitigación de condiciones de estrés exterior en la adaptación al ecosistema (Zhang et al., 2018).

El CMD es un conjunto de microorganismos PGPR, estos microorganismos realizan una contribución más allá de fijar nitrógeno al medio, ya que aportan beneficios directos o indirectos al cultivo. La influencia directa incluye la fijación biológica de nitrógeno y liberación de fosfato y algunos micronutrientes asociados por parte de bacterias asociadas al género *Bacillus*, la producción de auxinas como el ácido indolacético (AIA) y otras fitohormonas como ácido giberélico (GA3), citoquinina, ácido abscísico (ABA) y ACC-desaminasa, la cual reduce el

nivel de etileno en las raíces (Bhatt & Maheshwari, 2020; Santoyo et al., 2021). Los efectos indirectos están asociados a modificaciones en la rizósfera, previniendo o mitigando la acción de fitopatógenos mediante la liberación de sustancias como sideróforos, β -1, 3-glucanasas, quitinasas, antibióticos, quorum sensing (QS), pigmentos fluorescentes y cianidas (Bhattacharyya & Jha, 2012; Bukhat et al., 2020; A. Kumar et al., 2019).

4.3.2. Experimento en campo

El número de frutos por planta durante la cosecha se presentan en la Figura 4.1. T₂ tuvo la mayor producción con un promedio de 14,8 frutos, teniendo diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos, salvo con T₄ (11,4 frutos) y con T₈ y T₁₁ (12,8 y 12,2 frutos, respectivamente), estos dos últimos con los que compartía el mismo tipo de biofertilización (F₂). La biofertilización F₂ tuvo un desempeño con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a F₁ en tres de los cuatro suelos, siendo S₂ el único suelo en donde F₁ fue superior a los tratamientos con biofertilización. F₃ es similar en producción de frutos de F₁ en todos los suelos salvo S₂ en donde existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos.

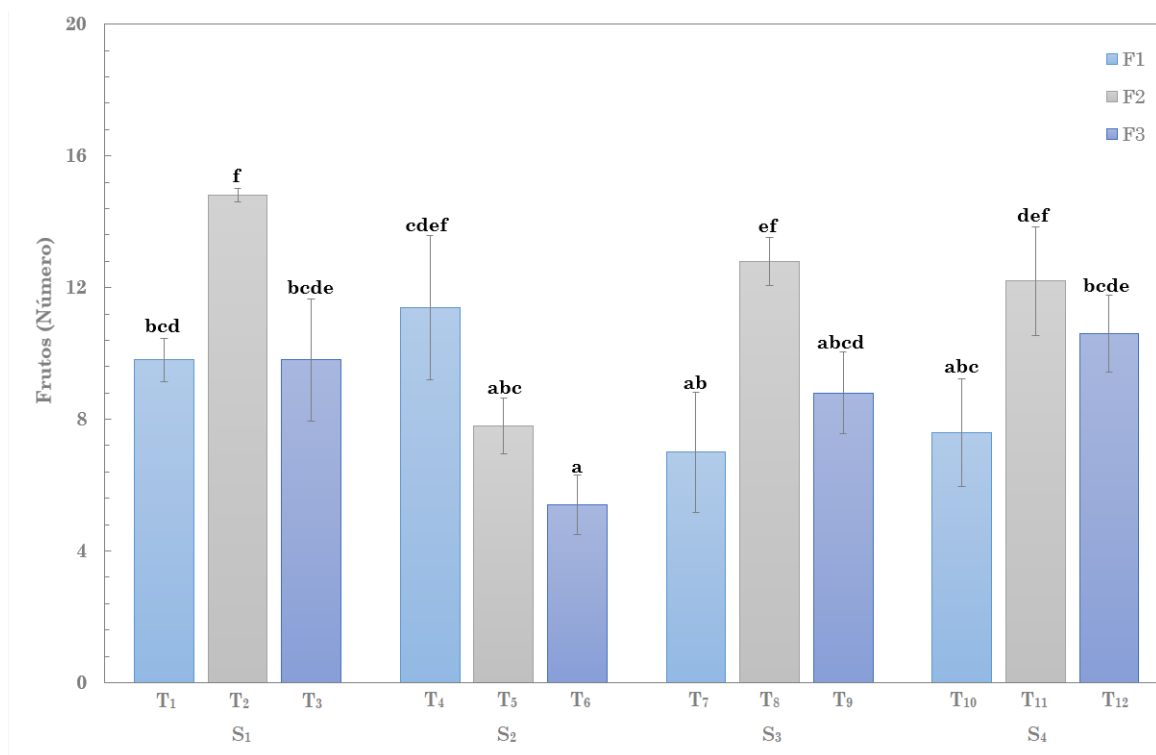


Figura 4.1. Número de frutos por planta para cada tratamiento.
F₁: Fertilización nitrogenada convencional, F₂: 66.6% de fertilizante nitrogenado y un 33.3% de un consorcio microbiano fijador de nitrógeno y F₃: 66.6% consorcio microbiano fijador de nitrógeno y 33.3% fertilizante nitrogenado. Letras diferentes sobre las barras indican una diferencia significativa $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba multirangos de Duncan.

Si se compara el tipo de fertilización indistintamente del tipo de suelo, los tratamientos que usaron CMD como biofertilizante tuvieron una mayor producción de frutos. La fertilización F₂ es la más eficiente en la producción de frutos con un promedio de 11.9 frutos, teniendo diferencias estadísticamente significativas tanto con F₁ (9 frutos) y F₃ (8.7 frutos). Estas dos últimas no presentan diferencias significativas (Ver Tabla 4.2). Un estudio realizado con una variedad de Ají Cayena en el suelo del municipio de Palmira (S₂) alcanzó una producción de 10 frutos por planta con un plan de fertilización química a los 107 días después de la siembra (Martinez, 2015). Este valor está por encima de la producción promedio del suelo S₂ y debajo de los 11.9 frutos promedio del tratamiento F₂.

Tabla 4.9 Rendimiento promedio en cantidad de frutos y peso por suelo y tipo de fertilización

Suelo	Frutos (número)	Peso (g)	Fertilización	Frutos (número)	Peso (g)
S ₁	11,5 ^b	192,5 ^b	F ₁	9,0 ^a	166,5 ^b
S ₂	8,2 ^a	132,1 ^a	F ₂	11,9 ^b	191,3 ^b
S ₃	9,5 ^{ab}	149,1 ^{ab}	F ₃	8,7 ^a	121,5 ^a
S ₄	10,1 ^{ab}	174,9 ^{ab}			

S₁: La Unión, S₂: Palmira, S₃: Pradera, S₄: Yotoco. F₁: Fertilización nitrogenada convencional, F₂: 66.6% de fertilizante nitrogenado y un 33.3% de un consorcio microbiano fijador de nitrógeno y F₃: 66.6% consorcio microbiano fijador de nitrógeno y 33.3% fertilizante nitrogenado. Letras diferentes en cada valor indican una diferencia significativa $p<0.05$ de acuerdo con la prueba multirango de Duncan para cada variable de respuesta.

Comparando cada tipo de suelo, T₂ presentó un 26% más de peso promedio en sus frutos que T₁ y para T₈ un 53% más de peso que T₇, valores superiores a estudios realizados con una variedad de pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) y reemplazando el 20% del total de la dosis de fertilización nitrogenada con *Bacillus siamensis*, el cual tuvo un rendimiento en la producción de pimientos 30% por encima de la fertilización convencional (Pastor-Bueis et al., 2017). Consorcios microbianos con una mezcla de Phosphorein® (un biofertilizante de fósforo que contiene disolventes de fosfato y bacterias solubilizadoras de silicato), Potassiumage® (Bacterias solubilizadoras de potasio) y Rhizobacterin® (un biofertilizante nitrogenado que contiene bacterias fijadoras de nitrógeno como Azotobacter) reemplazó un 25% de todo el plan de fertilización químico. Este estudio logró obtener un rendimiento igual al de la fertilización química convencional durante dos temporadas de cosecha (Ahmed et al., 2013).

El uso de biofertilizantes puede llegar a igualar el costo económico del uso de fertilizantes químicos, sin embargo su aplicación constante tiene beneficios medioambientales como la disminución de emisión de gases efecto invernadero y beneficio para el cultivo en sí como la movilización e intercambio de nutrientes, mejora la estructura y contenido de materia orgánica del suelo y se promueve el crecimiento de las raíces, promueve el desarrollo de asociaciones micorrícicas, lo

que aumenta la disponibilidad de fósforo (P) en el suelo y ayuda a eliminar las enfermedades plantares y proporciona un suministro continuo de micronutrientes al suelo (Sansinenea, 2021).

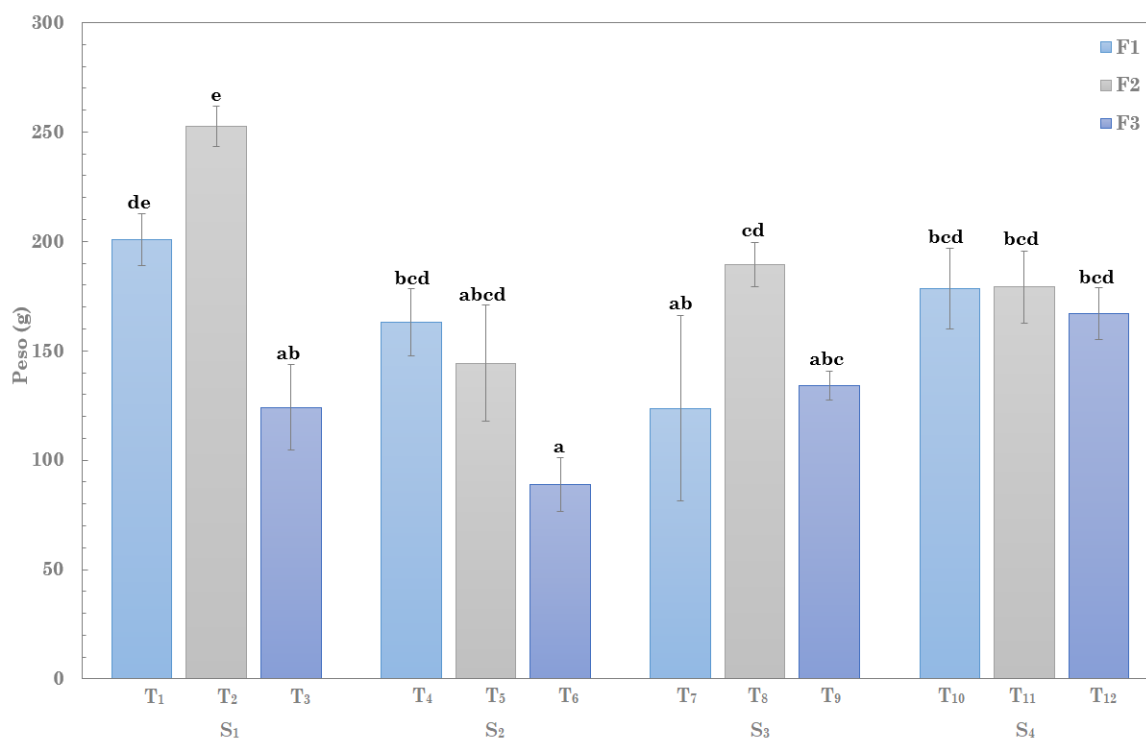


Figura 4.3. Peso (g) por planta promedio para cada suelo
F1: Fertilización nitrogenada convencional, F2: 66.6% de fertilizante nitrogenado y un 33.3% de un consorcio microbiano fijador de nitrógeno y F3: 66.6% consorcio microbiano fijador de nitrógeno y 33.3% fertilizante nitrogenado. Letras diferentes sobre las barras indican una diferencia significativa $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba multirango de Duncan

La prevalencia de interacciones positivas (comensalismo o mutualismo) entre miembros microbianos de un cultivo mixto o consorcio microbiano puede mejorar significativamente el resultado de un bioproceso, en este caso la biofertilización, asegurando su aplicación industrial y estabilidad a largo plazo (Ghosh et al., 2016). De acuerdo con el concepto de un potencial adaptativo mejorado postulado para los MCP, se registró una clara ventaja en comparación con los inoculantes de cepa única en el sistema de producción de tomate con riego por goteo en el desierto de Negev, expuesto a diversos desafíos ambientales, como altas temperaturas, limitaciones en la disponibilidad de agua, baja fertilidad y alto pH

del suelo. Los resultados apoyan la hipótesis de que el uso de microbios. Los consorcios pueden aumentar la eficiencia y reproducibilidad de las estrategias asistidas por BS para la producción de cultivos, particularmente en condiciones ambientales desafiantes.

Los suelos de Palmira y Yotoco sufrieron la enfermedad de nudo de raíz. Esta enfermedad es causada por la infección radicular de nematodos del género *Meloidogyne spp.*, la cual primero se manifiesta en la hipertrofia e hiperplasia de los tejidos radiculares donde se hospeda el nematodo y posteriormente a con pérdida de hojas, disminución en el peso y cantidad de frutos (S. Kumar et al., 2006). Para S₂ como se observa en la figura 4.4, a medida que se cambia fertilizante químico nitrogenado por CMD la progresión de la enfermedad disminuye y el sistema radicular comienza a presentar la prolongación de raíces secundarias de mayor volumen. En Yotoco (S₄), el uso de CMD como biofertilizante evitó la colonización del *Meloidogyne spp.* en ambos tratamientos con CMD, logrando que ambos tratamientos obtuvieran mayor cantidad de frutos y no tuvieran diferencias significativas en el peso de cada tratamiento. Los nematicidas por excelencia han sido los compuestos del grupo de los carbamatos, como el Carbaril, Aldicarb, Methomilo, Carbofuran, and Propoxur, los cuales han sido prohibidos en muchos países por su alto nivel de toxicidad tanto para humanos como para el medio ambiente (Kim et al., 2016; Noyes et al., 2009).



Figura 4.4. Raíces postcosecha de ají cultivado en cada tipo de suelo.
S₁: La Unión, S₂: Palmira, S₃: Pradera, S₄: Yotoco. F₁: Fertilización nitrogenada convencional, F₂: 66.6% de fertilizante nitrogenado y un 33.3% de un consorcio microbiano fijador de nitrógeno y F₃: 66.6% consorcio microbiano fijador de nitrógeno y 33.3% fertilizante nitrogenado.

El monocultivo intensivo de plantas de la familia Solanáceas como el ají, la berenjena y el tomate favorecen el establecimiento de poblaciones de ciertos patógenos de plantas, lo que se puede disminuir con una rotación continua de cultivos (Mamphogoro et al., 2020). Así mismo, el uso de microorganismos sea bien como fertilizante o plaguicida se ha comprobado que tiene efectos similares a los obtenidos en este estudio. El uso de una concentración de 2×10^8 de *P. aeruginosa* en un cultivo de Chile (*Capsicum annuum*) redujo hasta en un 71% el crecimiento de la segunda fase de estado larval de *Meloidogyne incognita* e igualmente su eclosión de huevos hasta 48 horas después de la inoculación de la bacteria (Abuzar, 2013). Estudios para la evaluación de la efectividad de bacterias para el control de nematodos demuestran que la asociación de diferentes géneros de bacterias es la opción más viable para la supresión de la infestación en raíces (Ezziyyani et al., 2007). Igualmente, microorganismos promotores de crecimiento como cepas del género *Streptomyces spp.*, poseen capacidades antibióticas por la producción de metabolitos secundarios complejos como la estreptomicina y neomicina (Lu et al., 2017).

Una dosis de 1×10^6 UFC de las cepas KPS-E004 y KPS- A032 de *Streptomyces spp.* en un cultivo de *Capsicum frutescens L.* redujo hasta 3.5 veces la infestación

en las raíces por parte de *M. incógnita*, comparado con el uso de las cepas por aparte. La biofertilización aplicada en S₂ y S₄ semanalmente en este estudio suprimió la infestación de raíces, suprimiendo la concentración de nemátodos que puede estar asociada a la sintetización de metabolitos secundarios complejos que produjeron una inhibición, toxicidad o patogenicidad de las bacterias sobre los huevos o en una fase temprana de crecimiento de *Meloidogyne spp.* Recientemente, (Topalović et al., 2019) descubrieron que cepas de *Microbacterium*, *Sphingopyxis*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, y *Micrococcus* colonizan la capa superficial de la cutícula flexible de *Meloidogyne hapla* durante su etapa infectiva, disminuyendo su movilidad y eclosión de huevos generando mortalidad. Ecológicamente, la interacción negativa entre el nemátodo residente en el suelo con los microorganismos inoculados como CMD podría considerarse amensalismo. El parásito preexistente en el suelo actúa como huésped de un conjunto de microorganismos que no obtienen beneficio de este, pero sí la presencia de los microorganismos perjudica al nemátodo.

4.4. Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran una opción biotecnológica a la fertilización nitrogenada convencional al reemplazar un porcentaje del plan nutricional del nitrógeno, por un consorcio microbiano de diazótrofos. Existen ventajas en términos de sostenibilidad ambiental, rendimiento del cultivo y un potencial control de plagas. Al usar el consorcio en combinación con el fertilizante químico no solo se igualó, sino que se superó la producción de frutos, evidenciando que el efecto de los microorganismos es en aporte de nitrógeno y adicionalmente en mejoramiento del suelo y el ecosistema microbiano al aportarse metabolitos secundarios como las hormonas promotoras de crecimiento con efectos integrales para el desarrollo y protección de las plantas, efecto que no logra la fertilización nitrogenada por sí misma. Esto representa una ventaja a los biofertilizantes existentes en el mercado, cuyo ingrediente

activo con frecuencia es un solo microorganismo, evaluado solamente para una función particular. Finalmente, la alternativa de fertilización complementaria funcionó para 3 de los 4 suelos evaluados, mostrando un potencial de aplicación amplio para suelos en el Valle del Cauca en el cultivo producto de investigación.

4.5. Bibliografía

- Abuzar, S. (2013). Antagonistic effects of some fluorescent pseudomonads strains against root-rot fungi (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*) and root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on chili (*Capsicum annum*). *World Applied Sciences Journal*, 27(11), 1455–1460. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.27.11.825>
- Ahmed, M. E. M., Abd-Ellatif, A. A., & Al-Araby, A. A. (2013). Growth, yield and fruit quality of sweet pepper plants as affected by some bioorganic and mineral fertilizers application. *Life Science Journal*, 10(4), 2756–2766.
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., & Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of Microbiology*, 62(2), 805–810. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0321-7>
- Bhatt, K., & Maheshwari, D. K. (2020). Zinc solubilizing bacteria (*Bacillus megaterium*) with multifarious plant growth promoting activities alleviates growth in *Capsicum annum* L. 3 *Biotech*, 10(2), 36. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2033-9>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 28, Issue 4, pp. 1327–1350). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bukhat, S., Imran, A., Javaid, S., Shahid, M., Majeed, A., & Naqqash, T. (2020). Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling. In *Microbiological Research* (Vol. 238, p. 126486). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126486>
- Carrión, V. J., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., de Hollander, M., Ruiz-Buck, D.,

- Mendes, L. W., van Ijcken, W. F. J., Gomez-Exposito, R., Elsayed, S. S., Mohanraju, P., Arifah, A., van der Oost, J., Paulson, J. N., Mendes, R., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Raaijmakers, J. M. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*, 366(6465), 606–612. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9285>
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., & Ravi, J. E. (2015). Inoculation with effective microbial consortia can reduce half the fertilizer application for *Andrographis paniculata* (kalmegh) under field condition. *Medicinal Plants*, 7(2), 103–108. <https://doi.org/10.5958/0975-6892.2015.00015.5>
- Dellagi, A., Quillere, I., & Hirel, B. (2020). Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa112>
- DSMZ. (2007). 441. *Diazotrophic Medium (RBA)* (p. 1). Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
- Elrys, A. S., Raza, S., Abdo, A. I., Liu, Z., Chen, Z., & Zhou, J. (2019). Budgeting nitrogen flows and the food nitrogen footprint of Egypt during the past half century: Challenges and opportunities. In *Environment International* (Vol. 130, p. 104895). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.06.005>
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea-Gilabert, C., & Candela, M. E. (2007). Biological Control of Phytophthora Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology*, 155(6), 342–349. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01237.x>
- Ghosh, S., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2016). Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4283–4295. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7448-1>
- 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). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071464>

- Jackson, M. L. (2005). Soil chemical analysis: Advanced course. In *University of Wisconsin & Madison Libraries Parallel Press* (2nd ed., Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/jpln.19590850311>
- Jiménez-Leyva, J. A., Gutiérrez, A., Orozco, J. A., Vargas, G., Esqueda, M., Gardea, A., González-Hernández, V., Sánchez, E., & Muñoz, E. (2017). Phenological and ecophysiological responses of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to native arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus availability. *Environmental and Experimental Botany*, 138, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.03.008>
- Kannepalli, A., Pengani, K. R., Yasin, J. K., Paul, S., Tyagi, S., Venkadasamy, G., Sharma, M., & Karivaradharajan, S. (2020). Genome Assembly of *Azotobacter chroococcum* Strain W5, a Free-Living Diazotroph Isolated from India. *Microbiology Resource Announcements*, 9(20). <https://doi.org/10.1128/MRA.00259-20>
- Kim, K.-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2016). *Exposure to pesticides and the associated human health effects*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Srivastava, R. (2019). Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 20, p. 101271). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101271>
- Kumar, S., Kumar, R., & Singh, J. (2006). Cayenne/American pepper. In *Handbook of Herbs and Spices* (Vol. 3, pp. 299–312). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1533/9781845691717.3.299>
- Liu, X., Zhou, J., Tian, J., Cheng, W., & Wang, X. (2020). *Herbaspirillum camelliae* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from *Camellia sinensis* L. *Archives of Microbiology*, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01892-1>
- Lu, F., Hou, Y., Zhang, H., Chu, Y., Xia, H., & Tian, Y. (2017). Regulatory genes and their roles for improvement of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. In *3 Biotech* (Vol. 7, Issue 4, pp. 1–15). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0875-6>
- Mahmud, K., Panday, D., Mergoum, A., & Missaoui, A. (2021). Nitrogen Losses and Potential Mitigation Strategies for a Sustainable Agroecosystem. *Sustainability* 2021, Vol. 13, Page

2400, 13(4), 2400. <https://doi.org/10.3390/SU13042400>

- Mamphogoro, T. P., Babalola, O. O., & Aiyegoro, O. A. (2020). Sustainable management strategies for bacterial wilt of sweet peppers (*Capsicum annuum*) and other Solanaceous crops. *Journal of Applied Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14653>
- Martinez, A. C. (2015). *Requerimientos nutricionales del ají Capsicum annuum L y su relación con rendimiento bajo condiciones ambientales de Palmira, Valle del Cauca*. Universidad Nacional de Colombia.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 5, pp. 634–663). <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- MinCIT. (2013). *Plan de Negocios de Ají*. Programa de transformación productiva. Ministerio de Ciencia y Tecnología, República de Colombia
- Mongkolporn, O. (2018). *Capsicum: Breeding Strategies for Anthracnose Resistance - Orarat Mongkolporn - Google Libros* (1st ed., Vol. 1). CRC Press.
- Mukherjee, T., Banik, A., & Mukhopadhyay, S. K. (2020). Plant Growth-Promoting Traits of a Thermophilic Strain of the Klebsiella Group with its Effect on Rice Plant Growth. *Current Microbiology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02032-0>
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Costas, A. G., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M. H., Oldroyd, G. E. D., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ané, J. M., & Peters, J. W. (2016). Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 82, Issue 13, pp. 3698–3710). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>
- Myrold, D. D. (2021). Transformations of nitrogen. *Principles and Applications of Soil Microbiology, Third Edition*, 385–421. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820202-9.00015-0>
- Noyes, P. D., McElwee, M. K., Miller, H. D., Clark, B. W., Van Tiem, L. A., Walcott, K. C., Erwin, K. N., & Levin, E. D. (2009). The toxicology of climate change: Environmental contaminants

- in a warming world. In *Environment International* (Vol. 35, Issue 6, pp. 971–986). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>
- Ogugua, U. V., Ntushelo, K., Makungu, M. C., & Kanu, S. A. (2018). Effect of *Bacillus subtilis* BD233 on seedlings growth of sweet pepper (*Capsicum annuum*), Swiss chard (*Beta vulgaris*) and lettuce (*Lactuca sativa*). *Acta Horticulturae*, 1204, 201–210. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1204.26>
- Pastor-Bueis, R., Mulas, R., Gómez, X., & González-Andrés, F. (2017). Innovative liquid formulation of digestates for producing a biofertilizer based on *Bacillus siamensis*: Field testing on sweet pepper. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(6), 748–758. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700200>
- Pinto, C. M. F., dos Santos, I. C., de Araujo, F. F., & da Silva, T. P. (2016). Pepper importance and growth (*capsicum* spp.). In *Production and Breeding of Chilli Peppers (Capsicum Spp.)* (pp. 1–25). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06532-8_1
- Plant Microbe Symbiosis. (2020). In A. Varma, S. Tripathi, & R. Prasad (Eds.), *Plant Microbe Symbiosis*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-36248-5>
- Said, S. Ben, & Or, D. (2017). Synthetic Microbial Ecology: Engineering Habitats for Modular Consortia. *Frontiers in Microbiology*, 1(8), 1125. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01125>
- Sansinenea, E. (2021). Application of biofertilizers: Current worldwide status. *Biofertilizers: Volume 1: Advances in Bio-Inoculants*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821667-5.00004-X>
- Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 219, 11(2), 219. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11020219>
- Stevens, C. J. (2019). Nitrogen in the environment. *Science*, 363(6427), 578–580. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV8215>
- Topalović, O., Elhady, A., Hallmann, J., Richert-Pöggeler, K. R., & Heuer, H. (2019). Bacteria

isolated from the cuticle of plant-parasitic nematodes attached to and antagonized the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47942-7>

Zaidi, A., Ahmad, E., Khan, M. S., Saif, S., & Rizvi, A. (2015). Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 193, pp. 231–239). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.020>

Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A., & Gedalanga, P. (2018). Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 11(5), 833–847. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>

CAPITULO V CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJOS FUTUROS

Hoy en día la fijación antropogénica de nitrógeno es una problemática ambiental en segundo plano. Los focos están sobre los impactos de los gases asociados al calentamiento global por la quema de combustibles fósiles, lo que convierte a la sobre disponibilidad de nutrientes en ecosistemas acuáticos y suelos en un tema irrelevante. Por ejemplo, para el caso latinoamericano, las políticas en materia normativa están aún tratando de cubrir las remociones, tratamientos y reducción de impactos de compuestos orgánicos provenientes de las aguas residuales, mientras que la eutrofización de ríos, humedales y océanos sufren cambios irreversibles.

Desarrollar una estrategia capaz de dirigir un consorcio microbiano a que su principal fuente de nitrógeno sea aquella capaz de ser fijada por un conjunto de bacterias fijadoras de nitrógeno, es una herramienta prometedora para diferentes alternativas biotecnológicas a evaluar. El capítulo II presentó un desarrollo con una estrategia previamente validada a nivel de maestría, para el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno heterótrofas y aerobias. Esta estrategia debe ser llevada a un nivel superior de investigación con la evaluación de crecimiento de consorcios microbianos en flujo continuo y con tasas de alimentación diferentes a las de los medios de cultivo estándar.

Con la evaluación de sustratos sólidos como los suelos o líquidos como los lodos de las aguas residuales, es posible plantear que a partir de cualquier ecosistema natural o construido, se puede obtener un inóculo base para la generación de consorcios microbianos con la capacidad de fijar nitrógeno. Esta estrategia de bioprospección puede ser usada para abordar problemáticas como la pérdida de biodiversidad en suelos con vocación agrícola. Un ejemplo interesante de bioprospección en este campo es generar consorcios microbianos con inóculos de

manglares de las costas Colombianas, en donde una vez establecido dicho consorcio, sea evaluado en suelos con altas concentraciones de salinidad, aprovechando la presencia de microorganismos halófilos en el inóculo original. Otra posibilidad sería enriquecer el suelo con su mismo inóculo, generando consorcios en reactores y reinyectando al suelo.

El capítulo III presentó una aproximación a una idea con un alto potencial de desarrollo. La degradación de celulosa por vía anaerobia de consorcios microbianos fijadores de nitrógeno y la producción de fitohormonas del grupo de las auxinas. Es una alternativa sostenible pensar en la generación de fitohormonas a partir de residuos agroindustriales. El ácido acético es económico e incluso puede ser producido a partir de los mismos residuos mediante fermentación acética del alcohol. Dicha fuente de carbono puede ser aprovechada por un consorcio para producir fitohormonas en campo que reduzcan el consumo de agroquímicos.

Otra posible investigación en este campo va más allá de generar biogas a partir de los residuos agroindustriales. Generar metabolitos intermedios de la digestión anaerobia como los ácidos grasos y a partir de ellos evaluar la producción de otras auxinas como el ácido indol-3-butírico, capaz de fortalecer el tejido radicular en plantas es una prometedora línea de investigación.

Igualmente, no se puede dejar a un lado profundizar en la producción de biogas. Existen diversos residuos agroindustriales con potencial de aprovechamiento y con un déficit nutricional que puede ser suplido por la adición de consorcios microbianos fijadores de nitrógeno. Si bien hay limitaciones en la disponibilidad de fuentes de carbono por la composición propia de los residuos lignocelulósicos, alternativas de hidrólisis química previa a la digestión anaerobia es una posibilidad plenamente validada.

Por otro lado, el capítulo IV mostró una aplicación a escala real con uno de los cultivos de mayor demanda en el mercado internacional producido en el Valle del Cauca. El ají presenta retos interesantes debido a su alta demanda nutricional y aún así hay resultados prometedores. Es muy viable realizar experimentos de este tipo en otro tipo de cultivos locales como la misma caña de azúcar o la palma de aceite africana y contemplar los consorcios microbianos fijadores de nitrógeno como biofertilizantes.

Ya como conclusión global y con una perspectiva integral, vemos que los resultados de cada capítulo son perfectamente etapas de un modelo de biorrefinería agroindustrial. El cual disminuiría las entradas de nutrientes por la propia producción de nitrógeno in situ para la valorización de residuos, potenciaría la generación de energías alternativas o sustratos para la generación de biofertilizantes y apuntaría a cultivos más sostenibles con nutrientes fijados en campo, disminuyendo la huella de carbono y nitrógeno.