

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS AUTOENSAMBLADOS FIJADORES DE N₂ y CO₂ ATMOSFÉRICO

Eliana Suárez López

Universidad del Valle, Apartado aéreo 25360, Cali, Colombia.

suarez.eliana@correounivalle.edu.co

Janeth Sanabria Gómez

Universidad del Valle, Apartado aéreo 25360, Cali, Colombia.

janeth.sanabria@correounivalle.edu.co

Andrés Orlando Castillo Giraldo

Universidad del Valle, Apartado aéreo 25360, Cali, Colombia.

andres.castillo@correounivalle.edu.co

Resumen

La fijación biológica de nitrógeno y dióxido de carbono, así como los mecanismos biológicos subyacentes a estos procesos han sido ampliamente estudiados; sin embargo, la exploración ecológica específica de comunidades bacterianas fuertemente seleccionadas para favorecer ambas capacidades metabólicas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas constituye un área de investigación innovadora. La comprensión de la estructura y funcionamiento de estas comunidades puede sentar las bases para futuras aplicaciones, por ejemplo, en el campo de la agricultura, con la fabricación de biofertilizantes nitrogenados. En este estudio, se construyeron consorcios microbianos utilizando muestras de ecosistemas altamente contrastantes (suelo, lodo y materia fecal humana). Estos consorcios se autoensamblaron en un biorreactor alimentado con un medio de cultivo mineral líquido, sin adición de compuestos nitrogenados o fuentes de carbono. El sistema operó con un flujo continuo de aire atmosférico que aportó N₂ y CO₂ y un recambio semanal del 50% del volumen. Se realizaron mediciones de nitrógeno total, pH, densidad óptica; y análisis de diversidad bacteriana con base en secuenciación de las regiones V3 y V4 del gen 16S ribosomal, para las muestras iniciales y las comunidades autoensambladas. Además, se predijeron las funciones metabólicas para las comunidades utilizando el software PICRUSt2 y se compararon las funciones obtenidas entre las comunidades ensambladas y las iniciales. Los resultados sugieren una asociación y syntrofia entre los miembros de las comunidades como respuesta a las condiciones de selección con un favorecimiento esperado de la fijación de N₂ y CO₂, metabolismos altamente extendidos entre las bacterias. Entre los géneros más abundantes se encontraron *Azospirillum*, *Gordonia*, *Burkholderia* y *Sphingobium*.

Abstract

The biological fixation of nitrogen and carbon dioxide, along with the underlying biological mechanisms of these processes, has been extensively studied; however, the specific ecological exploration of bacterial communities strongly selected to favor both metabolic capabilities and their potential biotechnological applications constitutes an innovative area of research. Understanding the structure and functioning of these communities may lay the groundwork for future applications, such as in the field of agriculture, particularly in the production of nitrogenous biofertilizers. In this study, microbial consortia were constructed using samples from highly contrasting ecosystems (soil, sludge, and human fecal matter). These consortia self-assembled in a bioreactor fed with a liquid mineral culture medium, without the addition of nitrogenous compounds or carbon sources. The system operated with a continuous flow of atmospheric air supplying N₂ and CO₂, with a 50% weekly replacement of the volume. Measurements of total nitrogen, pH, optical density, and bacterial diversity analysis based on sequencing the V3 and V4 regions of the 16S ribosomal gene were conducted for both initial samples and self-assembled communities. Furthermore, metabolic functions for the communities were predicted using PICRUSt2 software, and the obtained functions were compared between the assembled and initial communities. The results suggest an association and syntrophy among community members in response to selection

conditions, with an anticipated promotion of N_2 and CO_2 fixation—metabolic processes widely distributed among bacteria. Among the most abundant genera were *Azospirillum*, *Gordonia*, *Burkholderia*, and *Sphingobium*.

Palabras clave: Asociación, biorreactor, comunidad, diversidad, metabolismo, nitrógeno, sintrofia.

INTRODUCCIÓN

Tanto la fijación biológica de nitrógeno (FBN) como la fijación de CO_2 son procesos mediados por microorganismos e indispensables para la existencia de los ciclos biogeoquímicos del planeta (Zakem *et al.*, 2020).

La FBN consiste en la reducción del dinitrógeno (N_2) a amoníaco (NH_3) que se ioniza a rápidamente a amonio (NH_4^+) (Madigan *et al.*, 201; Bellenger *et al.*, 2020). Los microorganismos fijadores de N_2 y CO_2 están ampliamente distribuidos y pertenecen a diferentes grupos taxonómicos (Madigan *et al.*, 2015). Los diazótrofos comparten la presencia del complejo enzimático *nitrogenasa* en su forma funcional, lo que les permite catalizar dicha reacción (Madigan *et al.*, 2015). Los fijadores de nitrógeno simbióticos asociados a las leguminosas se han priorizado sobre los de vida libre, debido a su tasa individual de fijación de nitrógeno, la cual puede ser tres veces mayor (Mathesius, 2022; James, 2022; Rousk, 2022; Madigan *et al.*, 2015). Sin embargo, los fijadores de vida libre han recibido una gran atención en la última década debido a los beneficios que aportan a los cultivos de cereal, ya que estos cultivos juegan un papel importante en la seguridad alimentaria (Priyadarshini *et al.*, 2021; Rosenblueth *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2023); en el año 2021, los cultivos de leguminosas y cereales tuvieron una producción a nivel mundial de 89 y 2.227 millones de toneladas respectivamente (Statista Search Department, 2021). Los primeros fijadores de vida libre descritos fueron las cianobacterias en 1878 (Francis,

1878) y los *Azotobacter* en 1901 (Jensen, 1954), actualmente, el catálogo más reciente agrupa 190 especies descubiertas en todo tipo de ambiente (Dos Santos *et al.*, 2012).

En la fijación de CO₂, este gas se convierte en una forma orgánica de carbono (Gupta y Gupta, 2021). El Ciclo de Calvin, es una de las rutas más estudiadas por la cual se fija el CO₂ (Gupta y Gupta, 2021), se da gracias a la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO) (Gupta y Gupta, 2021; Guo *et al.*, 2013; Böhnke y Perner, 2017). Además del Ciclo de Calvin, se han descrito otras formas de fijación de CO₂: el Ciclo del Ácido Cítrico Inverso empleado por las bacterias verdes del azufre como *Chlorobium*, la ruta del hidroxipropionato utilizada por la bacteria verde *Chloroflexus* (Madigan *et al.*, 2015) y las rutas empleadas por las arqueobacterias hidrogenofílicas que incorporan CO₂ usando el H₂ como aceptor de electrones para la formación de CH₄ (Madigan *et al.*, 2015). Gracias a estos procesos, el carbono y el nitrógeno, compuestos indispensables para la vida, pasan a formar parte de la biósfera (Zakem *et al.*, 2020; Davies-Barnard y Friedlingstein, 2020; Meng *et al.*, 2022; Smercina *et al.*, 2019).

El estudio de los microorganismos en sus inicios empleó cultivos puros, este enfoque clásico ha sentado las bases del conocimiento en la microbiología (Goldford *et al.*, 2018). Sin embargo, la manera de estudiar los microorganismos ha venido evolucionando y ampliándose hacia un enfoque a nivel de comunidad (consorcio o microbiota) y microbioma. El cambio de enfoque ha resultado del reconocimiento de la importancia de las comunidades microbianas en diversas áreas aplicativas: en la agricultura con las comunidades bacterianas promotoras del crecimiento vegetal (Kaur y Vishnu, 2022; Fernanda de Souza Gênero *et al.*, 2020; Berendsen *et al.*, 2012); en la biorremediación de contaminantes complejos trabajando con humedales, lagunas y biorreactores (Dar *et al.*, 2019; Gosai *et al.*, 2022); y en la medicina, donde se investiga la funcionalidad del microbioma humano, el impacto de este en la salud y la búsqueda de terapias relacionadas a

trasplantes de microbioma (Gibson *et al.*, 2021; Harkins *et al.*, 2020; Oliver *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). A pesar de todos los avances en este campo, el estudio de las comunidades bacterianas sigue planteando grandes interrogantes debido a la alta complejidad y dinamismo metabólico que puede darse en su interior (Pascual-García *et al.*, 2020; Nemergut *et al.*, 2013). Algunos estudios acerca de la ecología microbiana y ensamblaje de comunidades bacterianas han encontrado que, bajo condiciones controladas, es posible detectar patrones reproducibles de organización, los cuales pueden ser explicados por medio de la competencia por recursos y la complementariedad metabólica (Pascual-García *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020). Además, se ha observado que la estabilidad funcional en las comunidades suele primar sobre fluctuaciones taxonómicas que se dan en respuesta a cambios ambientales (Ren *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022). Sin embargo, hoy en día es difícil trazar una línea clara que permita diferenciar entre las características funcionales adquiridas para un entorno específico y aquellas que son inherentes a comunidades altamente complejas (Goldford *et al.*, 2018).

A manera de antecedente cabe mencionar que, desde hace aproximadamente 11 años, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad del Valle, se ha venido trabajando en el estudio de la FBN en comunidades bacterianas. Diversos proyectos realizados en ambientes naturales y construidos han permitido examinar de primera mano los procesos al interior de las comunidades (Rodríguez-Gonzalez *et al.*, 2021; Ospina-Betancourth *et al.*, 2021). Adicionalmente, en algunos experimentos se observó la capacidad bacteriana de crecer en controles que no presentaban compuestos de nitrógeno combinado en el medio líquido, ni fuentes de carbono orgánico. Esta observación llevó a pensar en la posibilidad de la presencia de bacterias y/o comunidades bacterianas que puedan sobrevivir sin nitrógeno ni carbono disponible en el medio, capaces de obtener estos compuestos fijándolos del aire. La obtención de

comunidades fijadoras de N₂ y CO₂ además de ser un objetivo innovador, se vuelve interesante a nivel ecológico al intentar explicar cómo puede un conjunto de bacterias sobrevivir bajo estas condiciones tan críticas. Estudiar la diversidad, organización y funciones metabólicas presentes en las comunidades para sobrevivir bajo estas condiciones limitantes de nutrientes, podría ser el inicio para la futura aplicación de ingeniería de consorcios en el mejoramiento de estas comunidades (Duncker *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó un experimento con medidas en el tiempo para estudiar la ecología microbiana, con énfasis en las siguientes preguntas: i) ¿Es posible ensamblar comunidades bacterianas fijadoras de N₂ y CO₂ a partir de muestras obtenidas de ambientes altamente contrastantes?, ii) ¿es posible encontrar ambas capacidades metabólicas activas en una misma célula? o ¿se requiere de asociaciones entre distintas especies para que la comunidad sobreviva en un medio sin macronutrientes?. Para dar respuesta a esos interrogantes, se cultivaron diferentes microbiomas en biorreactores con medio líquido libre de fuentes de Nitrógeno y Carbono, estos compuestos se suplieron inyectando aire atmosférico para favorecer la fijación de N₂ y CO₂.

MÉTODOS

Origen y preparación de los inóculos

En el presente proyecto se utilizaron tres tipos de muestra: suelo; lodo; y materia fecal. El suelo rizosférico se obtuvo de las raíces de plantas de plátano, yuca y pasto cultivados en la finca Cañabravas. La finca se encuentra ubicada sobre una ladera poco pronunciada en la vereda San José (3°53'12,9"N, 76°22'9,2"), municipio El Darién, departamento del Valle del Cauca. Esta

zona se caracteriza por una temperatura promedio de 23°C (Gobernación del Valle del Cauca, 2015), una precipitación anual de 1.223 mm y nubosidad densa por momentos del día (Gobernación del Valle del Cauca, 2015). La finca fue seleccionada debido al manejo que implementan en los cultivos, el cual se realiza de manera manual y sin el uso de agroquímicos desde hace 10 años. La recolección de las muestras se realizó en el mes de octubre, en temporada de lluvias, entre las 10:00 y 12:00 h del día, el tiempo era soleado, el suelo se encontraba seco y desagregado en la superficie y, moderadamente húmedo en la zona de la rizosfera. El lodo provino de un sistema de tratamiento de residuos (reactor tipo UASB anaerobio), almacenado a temperatura ambiente y protegido de la incidencia de luz. Por último, la materia fecal humana se obtuvo de un donante anónimo, adulto mayor de sexo femenino, la cual refirió no presentar enfermedades de base ni tomar medicamentos, llevar un estilo de vida activo y seguir una dieta omnívora equilibrada. El procedimiento fue aprobado por el comité de ética de la facultad de Ciencias Naturales y Exactas (Acta de concepto a proyecto de Investigación N°014).

Se homogeneizaron 20 g de cada tipo de muestra en 20 ml de medio de cultivo para fijadores de nitrógeno modificado sin fuente de carbono orgánico (NFBm) con una composición g/L: 0,5 de fosfato dipotásico; 0,1 de cloruro de sodio; 0,2 sulfato de magnesio; 0,02 de cloruro de calcio; 0,1 de molibdato de sodio; 1,175 de sulfato de manganeso; 1,40 de ácido bórico; 0,04 de sulfato de cobre; 0,012 de sulfato de zinc; 5,56 de sulfato de hierro y 8,23 de Na₂EDTA. El medio se ajustó a un pH 7,0. Cada inóculo se repartió con una concentración del 1% para tres biorreactores y se emplearon tres biorreactores con el medio limpio.

Configuración de los biorreactores

Los biorreactores se diseñaron siguiendo el modelo básico de un quimiostato. Cada uno constó de un vaso con volumen total de 250 mL y volumen de operación de 100 mL conectado a un sistema

de dos mangueras: una adaptada con un filtro de tamaño de poro de 0,22 μm que permite la entrada de aire atmosférico; otra para toma de muestra e ingreso de medio limpio; y una salida de aire para regular la presión. Se usó una bomba RESUN AC9906 con potencia máxima de 14,0 L/min para ingresar aire atmosférico con un flujo de 1 L/h y agitación continua mecánica a 550 rpm en plancha de agitación Variomag Poly 15 a temperatura ambiente.

Operación de los biorreactores

Se implementó alimentación por lote con ciclos de 7 días. El proceso se inició agregando 1,0 mL del inóculo y se completó el volumen hasta 100 mL con medio NFBm en cada reactor. Cumplido cada ciclo, el 50% del contenido del biorreactor fue retirado y se reemplazó con medio fresco. Lo anterior fue llevado a cabo durante 6 ciclos continuos.

Variables fisicoquímicas

El Nitrógeno total (Nt) fue medido en cada biorreactor al final de cada ciclo usando el espectrofotómetro HI801 Iris (Hanna instruments) con el Kit HI93767 A-50 para nitrógeno total de bajo rango diseñado para este equipo y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La densidad óptica (OD) evaluada a 600 nm de longitud de onda y el pH fueron medidos con un espectrofotómetro de micro-volúmenes Hoefer Vision SP-2001 y un pH-metro Meters de Fisher scientific AB15, respectivamente.

Variables microbiológicas

La extracción de ADN de células bacterianas se llevó a cabo en las muestras antes de ser introducidas a los biorreactores, y luego, en los momentos de operación que presentaron mayores diferencias en la cantidad total de nitrógeno. En las extracciones se utilizaron 500 mg de la muestra inicial y/o pellet del centrifugado del efluente de los biorreactores. En todos los casos se

empleó agua destilada estéril y medio de cultivo NFBm como controles negativos y muestras de cultivo de *Escherichia coli* como control positivo. Para los anteriores procedimientos se utilizó el kit NucleoSpin Soil de Macherey-Nagel™ siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN obtenido fue calculada mediante la relación de absorbancia 260/280 con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, US). La secuenciación dirigida de las regiones V3 y V4 del gen 16S ribosomal se hizo por la tecnología Illumina paired-end con una profundidad de 20X, fueron usados 25 ng/ul de muestra y la pareja de primers 341F-805R propuestos por Herlemann (Herlemann *et al.*, 2011) para amplicones de 250 bp x 2 (~468 bp).

Análisis bioinformático

A las lecturas FASTQ obtenidas, se les realizó un control de calidad mediante el programa FASTQC (Andrews, 2010) con un PHRED > 20. Se empleó el programa Cutadapt (Martin, 2011) para eliminar lecturas correspondientes a primers. Las lecturas de 250 bp resultantes se superpusieron utilizando el programa FLASH (Magoč y Salzberg, 2011) generando así, lecturas de entre 400 a 464 bp. Para el proceso de limpieza de las lecturas de baja calidad se empleó el programa DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). La asignación taxonómica de los ASVs (Amplicon Sequence Variants) se llevó a cabo utilizando la base de datos Silva 138 integrada a la plataforma QIIME2 (Quast *et al.*, 2012; Bolyen *et al.*, 2019). Posteriormente se aplicó un filtro para trabajar en adelante con aquellos ASVs clasificados hasta el nivel taxonómico de género. Los análisis de diversidad alfa y beta se realizaron empleando el paquete de R, Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013). Para el análisis de diversidad alfa se calcularon los índices de Diversidad de Shannon, Dominancia de Berger Parker y Equidad de Pielou (Magurran, 1988; Baliton *et al.*, 2020; Reflinaldon y Hamid, 2023). En la beta diversidad, se utilizó la distancia de Bray curtis y un

modelo de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) para visualizar los resultados. Además, se predijeron las funciones metabólicas para las comunidades utilizando el software PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (Douglas *et al.*, 2020) y se compararon las funciones obtenidas entre las comunidades ensambladas y las iniciales.

RESULTADOS

Nitrógeno en los Biorreactores

En este estudio, se exploró y analizó la composición y dinámica de comunidades bacterianas ensambladas en biorreactores, centrándose en su capacidad para fijar N_2 y CO_2 . Las comunidades bacterianas ensambladas fueron seleccionadas según el momento en que se presentó la máxima tasa de nitrógeno acumulado. En la Fig. 1, se muestran las mediciones de Nt y OD; los datos en el tiempo cero (T_0), corresponde a los datos del contenido de los biorreactores al inicio del experimento, luego se presentan los valores de las mediciones para cada ciclo. Los biorreactores ‘suelo 1’ y ‘suelo 2’ presentaron la mayor cantidad de nitrógeno (6,3 y 8,0 mg/L) acumulado en el ciclo T_2 y ‘suelo 3’ en el ciclo T_6 . Los biorreactores inoculados con lodo presentaron la mayor cantidad de Nt acumulado (10,1; 7,1 y 4,9 mg/L) en el ciclo T_2 y los inoculados con heces en el ciclo T_4 . El pH se mantuvo entre 6,8 y 7,2 a lo largo del experimento para todos los biorreactores. Destaca la disminución del Nt en todos los casos después del ciclo con mayor cantidad de Nt acumulado, llegando a presentar valores de 0,4 mg/L en los biorreactores suelo 2 y suelo 3 y de 0,5 y 0,6 mg/L en los biorreactores lodo 1 y lodo 2, respectivamente. Los Biorreactores control 1

y control 2 permanecieron sin cambios en el nitrógeno medido hasta el ciclo T₄ y el control 3 hasta el ciclo T₆ (Material suplementario [S1](#)).

Resultados de Biodiversidad en los Reactores

A partir del procesamiento bioinformático de las lecturas, se obtuvo un total de 221.873 lecturas de alta calidad (phred>30), estas se agruparon en 2280 ASVs, repartidos entre 45 filos. El 94% de las lecturas se clasificaron hasta el nivel taxonómico género y 35% hasta especie. Entre los géneros más representativos, se identificaron: *Chthoniobacter*, *Caballeronia-Paraburkholderia*, *Mycobacterium*, *Azospirillum* y *Sediminibacterium*. Además, se observaron arqueas de los géneros *Bathyarchaeia*, *Methanosaeta* y *Methanoregula* en la muestra inicial de lodo y en algunas comunidades crecidas en los biorreactores con abundancias relativas $\leq 0,001$ para estas últimas.

En la Fig. 2 se presenta el análisis de diversidad alfa. Se observa una disminución en la diversidad de las comunidades autoensambladas (crecidas en el biorreactor) comparado con las comunidades iniciales. El índice de diversidad de Shannon para las comunidades de ‘Lodo’ y ‘Heces’ antes del biorreactor fue de 4,62 y 4,73 respectivamente, mientras que estas comunidades disminuyeron en riqueza (2,96 y 2,66) al crecer dentro del biorreactor. Las comunidades de suelo pre y post crecimiento en biorreactor, presentaron índices de 6,33 y 4,47 respectivamente. El índice de dominancia de Berger Parker presentó en todos los casos valores inferiores a 0,5; así mismo, el índice de Equidad de Pielou, presentó valores superiores a 0,5 para todas las comunidades.

El análisis de diversidad beta (Fig. 3) mostró un agrupamiento más cercano entre las comunidades autoensambladas de acuerdo con su origen y al tiempo, distanciadas de las

comunidades iniciales (Suelo, Lodo y Heces). Además, las comunidades iniciales fueron disímiles entre sí.

Hay diferencias en la composición de las comunidades autoensambladas, incluso, entre aquellas originadas a partir del mismo inóculo. Las Fig. 4, 5 y 6 presentan los diez géneros más abundantes (organizados de mayor a menor abundancia) para la comunidad inicial y las comunidades autoensambladas a partir de esta. En todos los casos, los diez géneros más abundantes en las comunidades iniciales no se comparten con los diez más abundantes de las comunidades autoensambladas. Además, se observó la emergencia de taxa en las comunidades autoensambladas, no observados en las comunidades iniciales. En el material suplementario S2, se presentan tres tablas que corresponden a la lista de taxa emergentes (recuadros en color amarillo) observados en las comunidades autoensambladas de suelo (s1, s2 y s3), lodo (l1, l2 y l3) y heces (h1, h2 y h3) y observados en las muestras iniciales (S, L y H).

DISCUSIÓN

Se empleó un medio de cultivo líquido mineral, libre de compuestos nitrogenados y carbonados. Para favorecer y seleccionar aquellos microorganismos capaces de fijar nitrógeno y CO₂, el cultivo en el biorreactor se suplemento con aire atmosférico (78% de N₂ y 0,036% CO₂ aproximadamente) (IDEAM, 2023). El recambio de cultivo por sustrato mineral semanal evitó acumulación de toxinas y brindó a las bacterias un tiempo para aclimatarse y crecer usando el N₂ y el CO₂ como fuentes de Nitrógeno y Carbono (Zavala *et al.*, 2020). En el momento en que se introdujo el inóculo al biorreactor, muchas especies se encontraron en condiciones ambientales limitantes (Wein y Dagan, 2019), lo que provocó una disminución de casi el 50% de la OD en

algunos casos (Fig. 1). Sin embargo, la OD y las concentraciones de Nt se mantuvieron relativamente estables a partir de la tercera semana, con aumentos leves en la concentración de Nt en la cuarta (Fig. 1). Este resultado, sumado a la presencia de fijadores de N₂ y de CO₂ en el cultivo (Fig. 4), implica una reacomodación ecológica y permite suponer que estos dos grupos de microorganismos son la base del sostenimiento de la población (Wang *et al.*, 2022; Hsu & Buckley, 2009; Peura *et al.*, 2018; Che *et al.*, 2018). Al final del experimento las mediciones de Nitrógeno descienden críticamente y el experimento se detiene. Es probable que la baja concentración de CO₂ en el aire (comparada a la del nitrógeno), haya limitado la fijación de este, lo que conllevaría a un bajo contenido de carbono disponible para las comunidades. Esto sugiere que, para un mantenimiento más prolongado de las comunidades cultivadas, se necesita una adición de CO₂ en concentraciones más altas, también podría optarse por ciclos de operación más prolongados y realizar el recambio del medio de cultivo líquido dejando sedimentar el contenido del biorreactor, en lugar de hacerlo en mezcla completa, con el fin de retirar metabolitos y conservar mayor cantidad de biomasa en el sistema.

Las distintas especies presentes en las comunidades autoensambladas demuestran que todas las transformaciones propias del ciclo del carbono y del nitrógeno ocurren al interior de los biorreactores, este fenómeno ya se ha descrito en otros estudios (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2021). El nitrógeno amoniacal (NH₄⁺) puede provenir de la desnitrificación o de la fijación de nitrógeno molecular. Una parte del amonio puede convertirse en nitrito (NO₂) o nitrato (NO₃), y otra puede ser transformada de nuevo a N₂ por bacterias desnitrificantes como *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Bacillus*. En el caso del carbono, el CO₂ aportado por el aire es aprovechado por autótrofos como *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Ferruginibacter*. Estos microorganismos lo podrían transformar a pequeñas moléculas orgánicas y estas ser compartidas a otras bacterias como el

género *Kaistia* que se caracteriza por emplear una amplia gama de fuentes de carbono (Jin *et al.*, 2012; Im *et al.*, 2004) (Fig. 4, 5 y 6).

La serie de transformaciones relacionadas con los ciclos del nitrógeno y carbono dentro del biorreactor se atribuye a la combinación de dos factores clave. En primer lugar, la elevada riqueza taxonómica de las comunidades iniciales (Fig. 2) (Magurran, 1988; Hussain *et al.*, 2022) que proporcionó un conjunto de herramientas metabólicas variadas, aumentando así las probabilidades de sobrevivencia en las condiciones extremas de nutrición y cultivo suministradas (Wein y Dagan, 2019). En segundo lugar, el biorreactor como herramienta de cultivo, no sólo brindó las condiciones necesarias para la selección, sino que también, promovió la reorganización de la comunidad y el desarrollo de asociaciones que serían imposibles de lograr con los métodos convencionales de cultivo (Chaudhary *et al.*, 2019; Stewart, 2012). Esta combinación de factores resultó en el autoensamblaje de comunidades con miembros abundantes que fijan N_2 y CO_2 , las cuales difieren en abundancia y composición de las comunidades iniciales, como se evidencia en el análisis de diversidad beta (Fig. 3), y poseen una riqueza suficiente para prosperar en un entorno deficiente de macronutrientes (Fig. 2). Además, la vinculación entre diferentes taxa para establecer asociaciones simbióticas se pudo demostrar, ya que de haber estado presente la capacidad de fijación de N_2 y CO_2 simultáneamente en un mismo microorganismo, se hubiese mantenido el cultivo a largo plazo, en lugar de decaer en los últimos ciclos de operación. El continuo recambio de medio pudo haber afectado las asociaciones preexistentes (establecidas en los ciclos con mayor concentración de N_t) generando un desequilibrio al eliminar miembros importantes de la comunidad (Fig. 1). Actualmente, no se conoce ninguna especie en que una misma célula sea capaz de fijar N_2 y CO_2 simultáneamente, sólo las cianobacterias son conocidas como fijadoras de N_2 y autótrofas capaces de llevar a cabo ambos procesos de manera sincrónica;

sin embargo, utilizan un mecanismo en el que los heterocistos incorporan dinitrógeno y comparten el producto fijado, mientras reciben carbono de células autótrofas (Madigan *et al.*, 2015). Además de las cianobacterias, existen pocas especies reportadas con la presencia de genes relacionados a la fijación de N₂ y CO₂. Una de ellas es el bacilo *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que posee genes para la nitrogenasa y la RubisCO tipo I, no obstante, su eficiencia en la FBN limita su crecimiento en comparación con el uso de nitrógeno asimilable del medio (Rawlings y Kusano, 1994; Ibáñez *et al.*, 2023; Fariq *et al.*, 2019).

Las Fig. 7 y 8, presentan las rutas metabólicas predichas con PICRUST2 para las comunidades iniciales y autoensambladas y sus abundancias. Por medio de estas predicciones y la prueba de comparaciones pareadas realizada con la función DESeq2 (Love *et al.*, 2014), se buscó explicar la organización de las comunidades autoensambladas. A partir de lo anterior, se observaron diferencias entre los metabolismos más abundantes antes y después del proceso de cultivo en el biorreactor. El Ciclo de Calvin, la Ruta del Acetil CoA y el Ciclo reductor del citrato serían vías menos usadas para la fijación de CO₂ en las comunidades autoensambladas (Buchanan *et al.*, 2017; Jiao *et al.*, 2021; Ivanovsky *et al.*, 2022). Mientras que la fijación de CO₂ mediante el Ciclo del 3-hidroxipropionato se vio favorecida al interior de los biorreactores, esta es una de las vías autótrofas evolutivamente más antiguas que permite la incorporación de compuestos intermediarios producidos generalmente por otros miembros de la comunidad (Herter *et al.*, 2002). Procesos como la oxidación del metano y la metanogénesis pueden contribuir notoriamente en el ciclo del carbono. El CH₄ puede ser incorporado del aire (Brimblecombe, 1996) u obtenido gracias a la metanogénesis (Kalyuzhnaya *et al.*, 2019), al ser oxidado, da como resultado CO₂ con el formaldehído y metanol como productos intermedios, los cuales pueden ser empleados por los metilótrofos para crecer (Boden, 2020; Chistoserdova y Lidstrom, 2011), entre

los que se encontraron los géneros *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Paracoccus* y *Xanthobacter* (Kim *et al.*, 2021; Czarnecki and Bartosik, 2019; Kamini *et al.*, 2018; Lidstrom, 2006). Además, la oxidación del metano puede estar acoplada a la sulfato-reducción, proceso que se ve favorecido gracias al SO_4 aportado en el medio, que sería reducido por géneros como *Desulfovibrio*, *Geobacter* y *Bilophila* (Madigan *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019; Kushkevych *et al.*, 2020; Xin *et al.*, 2020; Gao y Fan, 2023). En la metanogénesis hidrogenofílica, se emplea el CO_2 para generar el metano, de tal manera que se retroalimenta el ciclo (Westerholm *et al.*, 2022; Fang *et al.*, 2019). La producción de la coenzima M necesaria para catalizar la generación de CH_4 , fue obtenida en el análisis como ruta destacada (Wu *et al.*, 2022; Mand y Metcalf, 2019). En cuanto al metabolismo del nitrógeno, se deduce del análisis, la existencia de una mayor reducción del nitrato ya sea para ser asimilado (formación de proteínas y ácidos nucleicos) o para ser mineralizado en forma de NH_4^+ y volver a usarse en la nitrificación. La fijación de N_2 , de acuerdo con la prueba de comparaciones y como era de esperarse, fue una ruta mayormente empleada después del proceso de selección.

La selección ejercida en los biorreactores influyó en las características de las comunidades autoensambladas. La emergencia de miembros aparentemente “inexistentes” en las comunidades iniciales, es un fenómeno que ha sido observado en estudios previos con biorreactores (Chaudhary *et al.*, 2019; Li y Müller, 2023). Los biorreactores hacen visibles taxa que resultan difíciles de detectar en muestras ambientales debido a su baja abundancia, o a mecanismos de dormancia, como las esporas, que germinan dentro del biorreactor (De los Reyes *et al.*, 2015; Del *et al.*, 2004). No todos los géneros de autótrofos y fijadores de N_2 encontrados al final del experimento fueron representativos en la muestra inicial, y tampoco fueron observados los mismos géneros como los más abundantes entre los biorreactores a pesar de las similitudes en las

rutas metabólicas predichas (Fig. 7, 8 y 9). Resultados similares se han evidenciado en otras investigaciones, donde se aprecia una prevalencia de la función metabólica con variaciones en la taxonomía (Louca *et al.*, 2018). Además, los genes que intervienen en los ciclos biogeoquímicos y en reacciones redox son altamente conservados y extendidos en el dominio Bacteria (Jia y Whalen, 2020) y contribuyen a rutas metabólicas primigenias como las que se originaron bajo las condiciones de la atmósfera primitiva (Pla-García César Menor-Salván *et al.*, 2017). El apéndice A, muestra en orden de mayor a menor abundancia relativa la distribución microbiana en términos de funciones metabólicas ejemplificado a partir de la comunidad autoensamblada ‘heces 1’. Este fue construido por medio de las predicciones de las funciones metabólicas y verificado de forma manual, la asignación de dos colores indica que se han descrito ambos procesos metabólicos para dicho género. Este tipo de distribución fue observada en todas las comunidades autoensambladas donde se aprecia una organización en la cual se encuentran fijadores de nitrógeno y autótrofos de distintos géneros repartidos desde los más hasta los menos abundantes, acompañados por quimiolitótrofos e incluso fermentadores. La coexistencia de bacterias con metabolismos diversos en comunidades bacterianas en las que se favoreció de manera drástica la fijación de N_2 y CO_2 , sugiere la existencia de una interdependencia metabólica entre estos grupos bacterianos y plantea la posibilidad de una relación simbiótica o mutualista. Este fenómeno puede compararse conceptualmente con la relación simbiótica observada entre las bacterias anammox y sus compañeras, donde la colaboración entre los diferentes grupos bacterianos es fundamental para el funcionamiento armonioso de la comunidad (Wang *et al.*, 2022; Connan *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta lo anterior, en la Figura 9 se propone la organización de las comunidades autoensambladas, ejemplificada a partir de los diez géneros más abundantes de la comunidad ‘heces 1’. Las flechas que señalan hacia el interior de la bacteria representan el compuesto tomado por la célula, aquellas que ingresan y vuelven a salir de la célula representan los

compuestos tomados y el producto que se genera. Además, se especifica el H_2 y Fe en color rojo como fuentes de energía presentes en el medio empleadas por *Rhodococcus* y *Mycobacterium*.

Los resultados obtenidos respaldan la capacidad de la metodología empleada para la formación exitosa de comunidades bacterianas fijadoras de N_2 y CO_2 y evidencia el potencial del biorreactor para inducir la reestructuración de comunidades en respuesta a condiciones específicas. Adicionalmente, se abre un panorama nuevo sobre el ensamblaje de comunidades bacterianas, donde se puede indagar más a fondo sobre la ocurrencia de la sucesión en estas comunidades, comparar la riqueza taxonómica con la riqueza de genes para distintos metabolismos y explorar la posibilidad de prescindir de los taxa raros sin una afectación en el dinamismo de las comunidades. Esta primera aproximación se hizo aprovechando las ventajas de herramientas como PICRUSt2, tales como su facilidad de uso y bajos requerimientos computacionales. No obstante, se señala la necesidad de considerar herramientas con mayor confiabilidad en la asignación de funciones metabólicas, como la secuenciación de genoma completo (Shot-gun), que sirvan también para validar las metodologías que emplean los modelos predictivos.

CONCLUSIONES

Las asociaciones entre fijadores de N_2 y CO_2 son altamente codependientes de la presencia de heterótrofos que les proporcionen compuestos orgánicos como fuente energética ya que, los Fijadores de N_2 de vida libre necesitan el aporte de carbono que normalmente es brindado por la planta o se encuentra en el ambiente. Por ende, las comunidades fijadoras de nitrógeno enriquecidas mediante cultivo en biorreactores requieren de un aporte significativo de materia

orgánica para su sostenimiento en el tiempo. Adicionalmente, los fijadores de nitrógeno y autótrofos hacen parte también del microbiota intestinal humano y aún es materia oscura cómo sus metabolismos pudiesen aportar a procesos al interior del organismo.

Para exploraciones a futuro, se recomienda implementar métodos más directos, que contribuyan a resultados más robustos como la secuenciación de genoma completo para la anotación de funciones metabólicas y la PCR en tiempo real para evaluar la expresión génica. Además, apoyarse en la cuantificación de metabolitos esperados, así como estrategias avanzadas como el uso de isótopos marcados de los nutrientes suplementados para evaluar su consumo. Estas aproximaciones pueden brindar respuestas más detalladas y específicas sobre las actividades microbianas de interés.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad del Valle y el programa de Biología por formarme académica y profesionalmente. Agradezco a mis directores, los profesores Janeth Sanabria Gómez y Andrés Castillo Giraldo por su guía y dirección en este proyecto; a Juan Diego Duque Zapata y la profesora Diana López por su indispensable colaboración. Agradezco a mis padres William Suárez, Carmenza López, a mí hermano Esteban Suárez, a Angélica López y Juan Sebastián Gutiérrez por su apoyo incondicional a lo largo de todo mi proceso formativo.

LITERATURA CITADA

- Andrews. (2010). “FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.”
- Baliton, RS., Landicho, LD., Cabahug, RED., Paelmo, RF., Laruan, KA., Rodriguez, RS., Visco, RG., Castillo, AKA. (2020) ‘Ecological services of agroforestry systems in selected upland

- farming communities in the Philippines', *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(2), pp. 707–717. doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210237>.
- Bellenger, J.P., Darnajoux, R., Zhang, X. and Kraepiel, A.M.L. (2020), “Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review”, *Biogeochemistry*, Springer, 1 May, doi: 10.1007/s10533-020-00666-7.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. and Bakker, P.A.H.M. (2012), “The rhizosphere microbiome and plant health”, *Trends in Plant Science*, Vol. 17 No. 8, pp. 478–486, doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- Boden, R. (2020). Methanotrophy, Methyloctrophy, the Human Body, and Disease. In *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids* (pp. 245–264). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15147-8_19
- Böhnke, S. y Perner, M. (2017), “Unraveling RubisCO form I and form II regulation in an uncultured organism from a deep-sea hydrothermal Vent via metagenomic and mutagenesis studies”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 8 No. 1, pp. 1303–1317.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., *et al.* (2019), “Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2”, *Nature Biotechnology*, Vol. 37 No. 8, pp. 852–857, doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.
- Buchanan, B. B., Sirevåg, R., Fuchs, G., Ivanovsky, R. N., Igarashi, Y., Ishii, M., Tabita, F. R., & Berg, I. A. (2017). The Arnon–Buchanan cycle: a retrospective, 1966–2016. *Photosynthesis Research*, 134(2), 117–131. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0429-0>
- Brimblecombe, P. (1996) *Air Composition and Chemistry*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. and Holmes, S.P. (2016), “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data”, *Nature Methods*, Nature Publishing Group, Vol. 13 No. 7, pp. 581–583, doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Chaudhary, D.K., Khulan, A. and Kim, J. (2019), “Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria”, *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, Vol. 9 No. 1, doi: 10.1038/s41598-019-43182-x.
- Che, R., Deng, Y., Wang, F., Wang, W., Xu, Z., Hao, Y., Xue, K., Zhang, B., Tang, L., Zhou, H., & Cui, X. (2018). Autotrophic and symbiotic diazotrophs dominate nitrogen-fixing communities in Tibetan grassland soils. *Science of The Total Environment*, 639, 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.238>
- Chen, G., Li, J., Lv, H., Wang, S., Zuo, J. and Zhu, L. (2019), “Mesoporous coxs_n(1 - x)o₂ as an efficient oxygen evolution catalyst support for spe water electrolyzer”, *Royal Society Open Science*, Royal Society Publishing, Vol. 6 No. 4, doi: 10.6084/m9.figshare.

- Chen, H., Ma, K., Lu, C., Fu, Q., Qiu, Y., Zhao, J., ... & Chen, H. (2022) 'Functional Redundancy in Soil Microbial Community Based on Metagenomics Across the Globe', *Frontiers in Microbiology*, 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.878978>.
- Chistoserdova, L., & Lidstrom, M. E. (2011). Aerobic Methylophilic Prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 267–285.
- Connan, R., Dabert, P., Khalil, H., Bridoux, G., Béline, F. and Magrí, A., (2016) 'Batch enrichment of anammox bacteria and study of the underlying microbial community dynamics', *Chemical Engineering Journal*, 297, pp. 217–228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.154>.
- Czarnecki, J. y Bartosik, D. (2019) 'Diversity of Methylophilic Pathways in the Genus *Paracoccus* (Alphaproteobacteria)', *Current Issues in Molecular Biology*, 33, pp. 117–132. doi: <https://doi.org/10.21775/cimb.033.117>.
- Dar, M.A., Kaushik, G. and Villarreal-Chiu, J.F. (2019), "Pollution status and bioremediation of chlorpyrifos in environmental matrices by the application of bacterial communities: A review", *Journal of Environmental Management*, Academic Press, 1 June, doi: 10.1016/j.jenvman.2019.03.048.
- Davies-Barnard, T. and Friedlingstein, P. (2020), "The Global Distribution of Biological Nitrogen Fixation in Terrestrial Natural Ecosystems", *Global Biogeochemical Cycles*, Blackwell Publishing Ltd, Vol. 34 No. 3, doi: 10.1029/2019GB006387.
- Douglas, G.M., Maffei, V.J. and Zaneveld, J.R. (2020), "PICRUSt2 for prediction of metagenome functions", *Nat Biotechnol*, Vol. 38 No. 1, pp. 685–688.
- Duncker, K.E., Holmes, Z.A. and You, L. (2021), "Engineered microbial consortia: strategies and applications", *Microbial Cell Factories*, BioMed Central Ltd, Vol. 20 No. 1, p. 211, doi: 10.1186/s12934-021-01699-9.
- Lidstrom, M.E. (2006). Aerobic Methylophilic Prokaryotes. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. doi: https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_20
- Fang, W., Liang, Z., Liu, Y., Liao, J. and Wang, S. (2019), "Metagenomic insights into production of zero valent sulfur from dissimilatory sulfate reduction in a methanogenic bioreactor", *Bioresource Technology Reports*, Elsevier Ltd, Vol. 8, doi: 10.1016/j.biteb.2019.100305.
- Fariq, A., Blazier, J.C., Yasmin, A., Gentry, T.J. and Deng, Y. (2019), "Whole genome sequence analysis reveals high genetic variation of newly isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* IO-2C", *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, Vol. 9 No. 1, p. 13049, doi: 10.1038/s41598-019-49213-x.
- Fernanda de Souza Gênero, J., Messa, V.R., Beladeli, M.N., Torres da Costa, A.C. and Duarte Júnior, J.B. (2020), "Rhizosphere nitrogen-fixing bacteria (free-living) contribute to nitrogen absorption in wheat", *Rhizosphere*, Elsevier B.V., Vol. 16, doi: 10.1016/j.rhisph.2020.100245.

- FRANCIS, G. (1878), “Poisonous Australian Lake”, *Nature*, Vol. 18 No. 444, pp. 11–12, doi: 10.1038/018011d0.
- Gao, P. y Fan, K. (2023), “Sulfur-oxidizing bacteria (SOB) and sulfate-reducing bacteria (SRB) in oil reservoir and biological control of SRB: a review”, *Archives of Microbiology*, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 May, doi: 10.1007/s00203-023-03520-0.
- Gibson, C.M., Childs-Kean, L.M., Naziruddin, Z. and Howell, C.K. (2021), “The alteration of the gut microbiome by immunosuppressive agents used in solid organ transplantation”, *Transplant Infectious Disease*, Blackwell Publishing Inc., Vol. 23 No. 1, doi: 10.1111/tid.13397.
- Goldford, J.E., Lu, N., Bajić, D., Estrela, S., Tikhonov, M., Sanchez-Gorostiaga, A., Segrè, D., *et al.* (2018), “Emergent simplicity in microbial community assembly”, *Science*, Vol. 361 No. 6401, pp. 469–474, doi: 10.1126/science.aat1168.
- Gosai, H.B., Panseriya, H.Z., Patel, P.G., Patel, A.C., Shankar, A., Varjani, S. and Dave, B.P. (2022), “Exploring bacterial communities through metagenomics during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated sediments”, *Science of the Total Environment*, Elsevier B.V., Vol. 842, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156794.
- Gobernación del Valle del Cauca, 2015. Diagnóstico estratégico del sector Calima Darién. <https://www.valledelcauca.gov.co/loader.php?lServicio=Tools2&lTipo=viewpdf&id=26328#:~:text=La%20cabecera%20municipal%20est%C3%A1%20ubicada,rural%20de%20254%20Km%20cuadrados>.
- Gobernación del Valle del Cauca, 2015. Plan de desarrollo territorial 2012-2015. <https://repositoriocdim.esap.edu.co/bitstream/handle/123456789/20578/24709-1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Guo, K., Yang, J., Yu, N., Luo, L., & Wang, E. (2023). Biological nitrogen fixation in cereal crops: Progress, strategies, and perspectives. *Plant Communications*, 4(2), 100499. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100499>
- Guo, X., Yin, H., Cong, J., Dai, Z., Dai, Y. and Liu, X. (2013), “RubisCO gene clusters found in a metagenome microarray from acid mine drainage”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 79 No. 6, pp. 2019–2026, doi: 10.1128/AEM.03400-12.
- Gupta, R. and Gupta, N. (2021). *Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism*.
- Harkins, C.P., Kong, H.H. and Segre, J.A. (2020), “Manipulating the Human Microbiome to Manage Disease”, *JAMA - Journal of the American Medical Association*, American Medical Association, 28 January, doi: 10.1001/jama.2019.19602.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5(10), 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>

- Herter, S., Fuchs, G., Bacher, A. and Eisenreich, W. (2002), “A bicyclic autotrophic CO₂ fixation pathway in *Chloroflexus aurantiacus*”, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277 No. 23, pp. 20277–20283, doi: 10.1074/jbc.M201030200.
- Hsu, S.-F., & Buckley, D. H. (2009). Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *The ISME Journal*, 3(1), 124–136. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.82>
- Hussain, N.A., Ali, A.H. y Lazem, L.F. (2022) ‘Ecological indices of key biological groups in Southern Iraqi marshland during 2005-2007’, *Mesopotamian Journal of Marine Sciences*, 27(2), pp. 112–125. doi: <https://doi.org/10.58629/mjms.v27i2.162>.
- Ibáñez, A., Barreiro, C., Díez-Galán, A., Cobos, R., Calvo-Peña, C. and Coque, J.J.R. (2023), “Molecular Identification and Acid Stress Response of an *Acidithiobacillus thiooxidans* Strain Isolated from Rio Tinto (Spain)”, *International Journal of Molecular Sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Vol. 24 No. 17, p. 13391, doi: 10.3390/ijms241713391.
- IDEAM - ATMÓSFERA (2023) Gov.co. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/atmosfera> (Consultado: el 13 de diciembre de 2023).
- Im, W.-T., Yokota, A., Kim, M.-K. and Lee, S.-T. (2004), “*Kaistia adipata* gen. nov., sp. nov., a novel. ALPHA.-proteobacterium”, *The Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 50 No. 5, pp. 249–254, doi: 10.2323/jgam.50.249.
- Ivanovsky, R. N., Lebedeva, N. V., & Tourova, T. P. (2022). A New Glance on the Mechanism of Autotrophic CO₂ Assimilation in Green Sulfur Bacteria. *Microbiology*, 91(3), 225–234. <https://doi.org/10.1134/S0026261722300026>
- James, E.K. (2022), “The seeds of nodulation”, *Journal of Plant Physiology*, Elsevier GmbH, 1 November, doi: 10.1016/j.jplph.2022.153812.
- Jensen, H.L. (1954), “THE AZOTOBACTERIACEAE”, *Bacteriological Reviews*, Vol. 18 No. 4, pp. 195–214, doi: 10.1128/br.18.4.195-214.1954.
- JIA, Y. y WHALEN, J.K. (2020), “A new perspective on functional redundancy and phylogenetic niche conservatism in soil microbial communities”, *Pedosphere*, Soil Science Society of China, Vol. 30 No. 1, pp. 18–24, doi: 10.1016/S1002-0160(19)60826-X.
- Jiao, J.-Y., Fu, L., Hua, Z.-S., Liu, L., Salam, N., Liu, P.-F., Lv, A.-P., Wu, G., Xian, W.-D., Zhu, Q., Zhou, E.-M., Fang, B.-Z., Oren, A., Hedlund, B. P., Jiang, H.-C., Knight, R., Cheng, L., & Li, W.-J. (2021). Insight into the function and evolution of the Wood–Ljungdahl pathway in Actinobacteria. *The ISME Journal*, 15(10), 3005–3018. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00935-9>

- Jin, L., Kim, K.K., Lee, H.G., Ahn, C.Y. and Oh, H.M. (2012), “*Kaistia defluvii* sp. nov., isolated from river sediment”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 62 No. 12, pp. 2878–2882, doi: 10.1099/ij.s.0.038687-0.
- Kalyuzhnaya, M.G., Gomez, O.A. and Murrell, J.C. (2019), “The Methane-Oxidizing Bacteria (Methanotrophs)”, *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*, Springer International Publishing, pp. 245–278, doi: 10.1007/978-3-030-14796-9_10.
- Kamini., Sharma, R., Puneekar, NS., Phale, PS. (2018), ‘Carbaryl as a Carbon and Nitrogen Source: an Inducible Methylamine Metabolic Pathway at the Biochemical and Molecular Levels in *Pseudomonas* sp. Strain C5pp’, *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by R.E. Parales, 84(24). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01866-18>.
- Kaur, J. y Vishnu. (2022), “Bacterial inoculants for rhizosphere engineering: Applications, current aspects, and challenges”, *Rhizosphere Engineering*, Academic Press, pp. 129–150, doi: 10.1016/B978-0-323-89973-4.00004-1.
- Kim, I.-T.; Ahn, K.-H.; Lee, Y.-E.; Jeong, Y.; Park, J.-R.; Shin, D.-C.; Jung, J. (2021), ‘An Experimental Study on the Biological Fixation and Effective Use of Carbon Using Biogas and Bacterial Community Dominated by Methanotrophs, Methanol-Oxidizing Bacteria, and Ammonia-Oxidizing Bacteria’, *Catalysts*, 11(11), p. 1342. doi: <https://doi.org/10.3390/catal11111342>.
- Kushkevych, I., Cejnar, J., Treml, J., Dordević, D., Kollar, P. and Vítězová, M. (2020), “Recent Advances in Metabolic Pathways of Sulfate Reduction in Intestinal Bacteria”, *Cells*, NLM (Medline), 12 March, doi: 10.3390/cells9030698.
- Li, S. y Müller, S. (2023), “Ecological forces dictate microbial community assembly processes in bioreactor systems”, *Current Opinion in Biotechnology*, Elsevier Ltd, Vol. 81, p. 102917, doi: 10.1016/j.copbio.2023.102917.
- De los Reyes, F.L., Weaver, J.E. and Wang, L. (2015), “A methodological framework for linking bioreactor function to microbial communities and environmental conditions”, *Current Opinion in Biotechnology*, Elsevier Ltd, Vol. 33, pp. 112–118, doi: 10.1016/j.copbio.2015.02.002.
- Louca, S., Polz, M.F., Mazel, F., Albright, M.B.N., Huber, J.A., O’Connor, M.I., Ackermann, M., et al. (2018), “Function and functional redundancy in microbial communities”, *Nat Ecol Evol.*, Vol. 2 No. 6, pp. 936–943.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014), “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2”, *Genome Biology*, BioMed Central Ltd., Vol. 15 No. 12, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. and Stahl, D. (2015), *Biología de Los Microorganismos*, 14th ed., Pearson, Madrid.

- Magoč, T. and Salzberg, S.L. (2011), “FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies”, *Bioinformatics*, Vol. 27 No. 21, pp. 2957–2963, doi: 10.1093/bioinformatics/btr507.
- Magurran, A.E. (1988) *Ecological Diversity and Its Measurement*. Dordrecht: Springer Netherlands. doi: <https://doi.org/10.1007/978-94-015-7358-0>.
- Mand, T.D. and Metcalf, W.W. (2019), “Energy Conservation and Hydrogenase Function in Methanogenic Archaea, in Particular the Genus *Methanosarcina*”, doi: 10.1128/MMBR.
- Martin, M. (2011), “Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads”, *EMBnet.Journal*, Vol. 17 No. 1, p. 10, doi: 10.14806/ej.17.1.200.
- Mathesius, U. (2022), “Are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses”, *Journal of Plant Physiology*, Elsevier GmbH, 1 September, doi: 10.1016/j.jplph.2022.153765.
- McMurdie, P.J. and Holmes, S. (2013), “phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data”, edited by Watson, M. *PLoS ONE*, Vol. 8 No. 4, p. e61217, doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Meng, S., Peng, T., Liu, X., Wang, H., Huang, T., Gu, J.-D. and Hu, Z. (2022), “Ecological Role of Bacteria Involved in the Biogeochemical Cycles of Mangroves Based on Functional Genes Detected through GeoChip 5.0”, edited by Suen, G. *MSphere*, Vol. 7 No. 1, doi: 10.1128/msphere.00936-21.
- Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O’Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F., Knelman, J. E., Darcy, J. L., Lynch, R. C., Wickey, P., & Ferrenberg, S. (2013). Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 342–356. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00051-12>
- Oliver, A., Xue, Z., Villanueva, Y.T., Durbin-Johnson, B., Alkan, Z., Taft, D.H., Liu, J., *et al.* (2022), “Association of Diet and Antimicrobial Resistance in Healthy U.S. Adults”, edited by Pettigrew, M.M. *MBio*, American Society for Microbiology, Vol. 13 No. 3, doi: 10.1128/mbio.00101-22.
- Ospina-Betancourth, C., Acharya, K., Sanabria, J. and Curtis, T.P. (2021), “Low inhibitory effect of ammonia on the nitrogen-fixing activity of a sludge enriched with nitrogen-fixing bacteria”, *Bioresource Technology Reports*, Elsevier Ltd, Vol. 14, p. 100655, doi: 10.1016/j.biteb.2021.100655.
- Pascual-García, A., Bonhoeffer, S., & Bell, T. (2020). Metabolically cohesive microbial consortia and ecosystem functioning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1798). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0245>

- Peura, S., Buck, M., Aalto, S. L., Morales, S. E., Nykänen, H., & Eiler, A. (2018). Novel Autotrophic Organisms Contribute Significantly to the Internal Carbon Cycling Potential of a Boreal Lake. *MBio*, 9(4), doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.00916-18>.
- Pla-García César Menor-Salván, J., Menor-Salván, C., Pla-García, J. and Oxidado, C.H. (2017), *La Composición Química de La Atmósfera Primitiva Del Planeta Tierra*, *An. Quím*, Vol. 113.
- Priyadarshini, P., Choudhury, S., Tilgam, J., Bharati, A., & Sreeshma, N. (2021). Nitrogen fixing cereal: A rising hero towards meeting food security. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 912–920. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.09.012>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., *et al.* (2012), “The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 41 No. D1, pp. D590–D596, doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Rawlings, D.E. y Kusano, T. (1994), “Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*”, *Microbiological Reviews*, Vol. 58 No. 1, pp. 39–55, doi: 10.1128/mr.58.1.39-55.1994.
- Reflinaldon y Hamid, H. (2023) ‘Insect diversity on wheat as a new cultivation crop in West Sumatera’, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1133(1), p. 012068. doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1133/1/012068>.
- Ren, Y., Xun, W., Yan, H., Ma, A., Xiong, W., Shen, Q., & Zhang, R. (2020). Functional compensation dominates the assembly of plant rhizospheric bacterial community. *Soil Biology and Biochemistry*, 150, 107968, doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107968>
- Rodriguez-Gonzalez, C., Ospina-Betancourth, C. and Sanabria, J. (2021), “High Resistance of a Sludge Enriched with Nitrogen-Fixing Bacteria to Ammonium Salts and Its Potential as a Biofertilizer”, *Bioengineering*, MDPI AG, Vol. 8 No. 5, p. 55, doi: 10.3390/bioengineering8050055.
- Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C., Reddy, P. M., & Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen Fixation in Cereals. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>
- Rousk, K. (2022), “Biotic and abiotic controls of nitrogen fixation in cyanobacteria–moss associations”, *New Phytologist*, John Wiley and Sons Inc, Vol. 235 No. 4, pp. 1330–1335, doi: 10.1111/nph.18264.
- RStudio Team. (2020), “RStudio: Integrated Development for R.”, RStudio.
- Dos Santos, P.C., Fang, Z., Mason, S.W., Setubal, J.C. and Dixon, R. (2012), *Distribution of Nitrogen Fixation and Nitrogenase-like Sequences amongst Microbial Genomes*.
- Smercina, D.N., Evans, S.E., Friesen, M.L. and Tiemann, L.K. (2019), “To fix or not to fix: Controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere”, *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, 1 March, doi: 10.1128/AEM.02546-18.

- Statista Search Department (2021, September 13th) *Leading software as a service (SaaS) countries worldwide in 2021, by number of companies* [Infographic]. Statista. <https://es.statista.com/>
- Stewart, E.J. (2012), “Growing unculturable bacteria”, *Journal of Bacteriology*, August, doi: 10.1128/JB.00345-12.
- Wang, L., Gu, W., Liu, Y., Liang, P., Zhang, X. and Huang, X. (2022) ‘Challenges, solutions and prospects of mainstream anammox-based process for municipal wastewater treatment’, *Science of The Total Environment*, 820, p. 153351. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153351>.
- Wang, X., Li, W., Cheng, A., Shen, T., Xiao, Y., Zhu, M., Pan, X., & Yu, L. (2022). Community characteristics of autotrophic CO₂-fixing bacteria in karst wetland groundwaters with different nitrogen levels. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.949208>
- Wein, T. and Dagan, T. (2019), “The Effect of Population Bottleneck Size and Selective Regime on Genetic Diversity and Evolvability in Bacteria”, *Genome Biology and Evolution*, NLM (Medline), Vol. 11 No. 11, pp. 3283–3290, doi: 10.1093/gbe/evz243.
- Westerholm, M., Calusinska, M. and Dolfing, J. (2022), “Syntrophic propionate-oxidizing bacteria in methanogenic systems”, *FEMS Microbiology Reviews*, Oxford University Press, 1 March, doi: 10.1093/femsre/fuab057.
- Wu, H.-H., Pun, M.D., Wise, C.E., Streit, B.R., Mus, F., Berim, A., Kincannon, W.M., *et al.* (2022), “The pathway for coenzyme M biosynthesis in bacteria”, doi: 10.1073/pnas.
- Xin, Y., Gao, R., Cui, F., Lü, C., Liu, H., Liu, H., Xia, Y., *et al.* (2020), “The Heterotrophic Bacterium *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 Oxidizes Sulfide to Sulfate with Thiosulfate as a Key Intermediate”, doi: 10.1128/AEM.
- Zakem, E.J., Polz, M.F. and Follows, M.J. (2020), “Redox-informed models of global biogeochemical cycles”, *Nature Communications*, Nature Research, Vol. 11 No. 1, p. 5680, doi: 10.1038/s41467-020-19454-w.
- Zavala, J., Alcarraz, M. and Julian, J. (2020), “Evaluación para la producción de *Azotobacter* sp. promotor de crecimiento para cultivos de *Coffea arabica*”, *Ciencia e Investigación*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Vicerrectorado de Investigación, Vol. 23 No. 1, pp. 45–50, doi: 10.15381/ci.v23i1.18751.
- Zhang, L., Wang, Z., Zhang, X., Zhao, L., Chu, J., Li, H., Sun, W., *et al.* (2022), “Alterations of the Gut Microbiota in Patients with Diabetic Nephropathy”, edited by Claesen, J. *Microbiology Spectrum*, American Society for Microbiology, Vol. 10 No. 4, doi: 10.1128/spectrum.00324-22.

Figura 1. Mediciones de nitrógeno total (Nt) y densidad óptica (OD) para los efluentes de los biorreactores. A) Biorreactores suelo 1, suelo 2 y suelo 3. B) Biorreactores lodo 1, lodo 2 y lodo 3. C) Biorreactores heces 1, heces 2 y heces 3. *Ciclo en que se obtuvo la mayor medición de Nt acumulado incorporado.

Figura 2. Análisis de diversidad alfa para las comunidades iniciales y las comunidades ensambladas en cultivo semicontinuo en Biorreactores, agrupadas según su origen.

Figura 3. Análisis de diversidad Beta basado en distancias de Bray Curtis. Los nombres con inicial mayúscula hacen referencia a las comunidades iniciales. Los nombres en minúscula hacen referencia a las comunidades autoensambladas en los biorreactores.

Figura 4. Géneros más abundantes para comunidad inicial de 'Suelo' y comunidades autoensambladas. A) Comunidad inicial 'Suelo'. B, C, D) Comunidades autoensambladas 'suelo 1', 'suelo 2' y 'suelo 3'. *Fijadores de nitrógeno; 'Autótrofos.

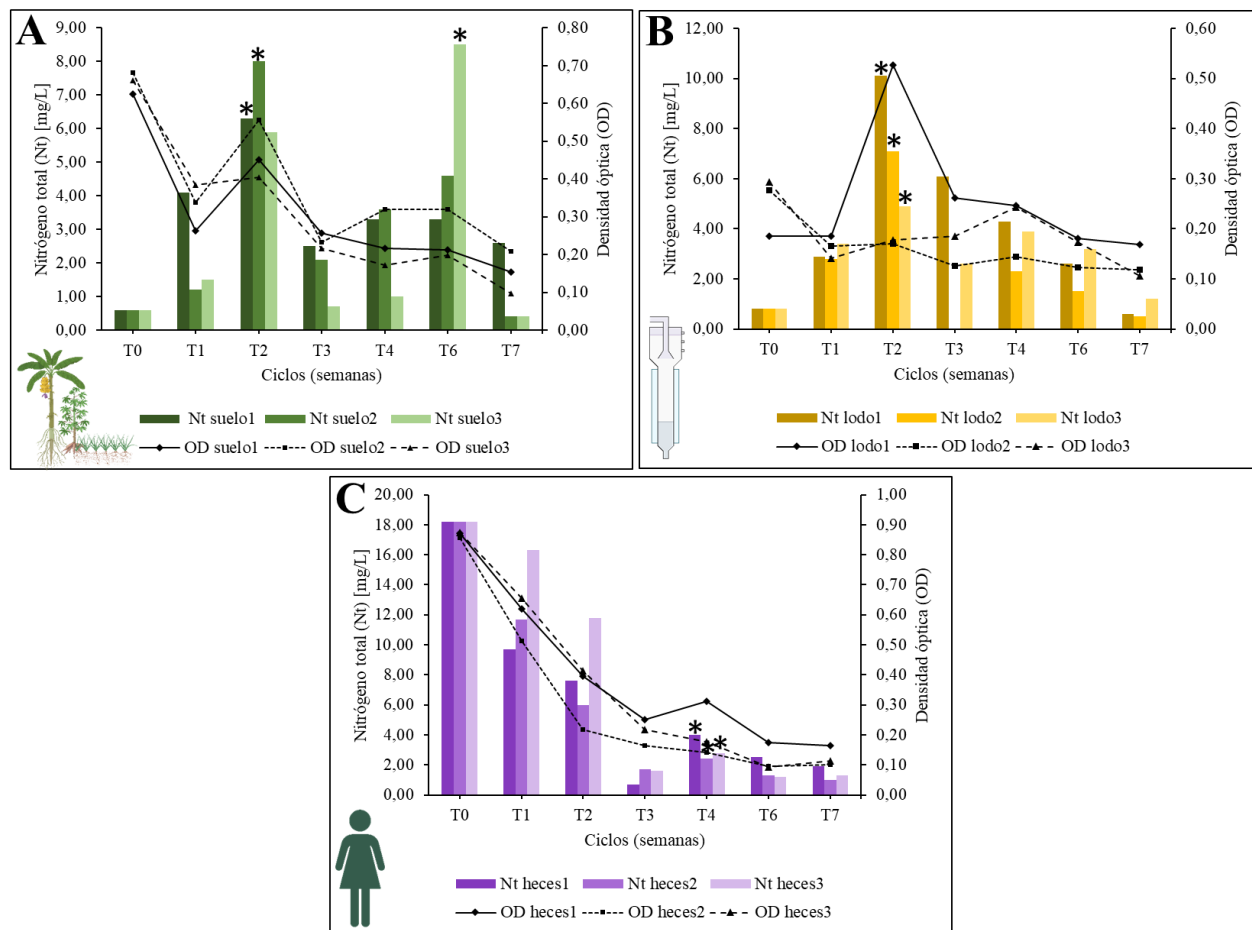
Figura 5. Géneros más abundantes para comunidad inicial de Lodo y comunidades autoensambladas. A) Comunidad inicial Lodo. B, C, D) Comunidades autoensambladas 'lodo 1', 'lodo 2' y 'lodo 3'. *Fijadores de nitrógeno; 'Autótrofos.

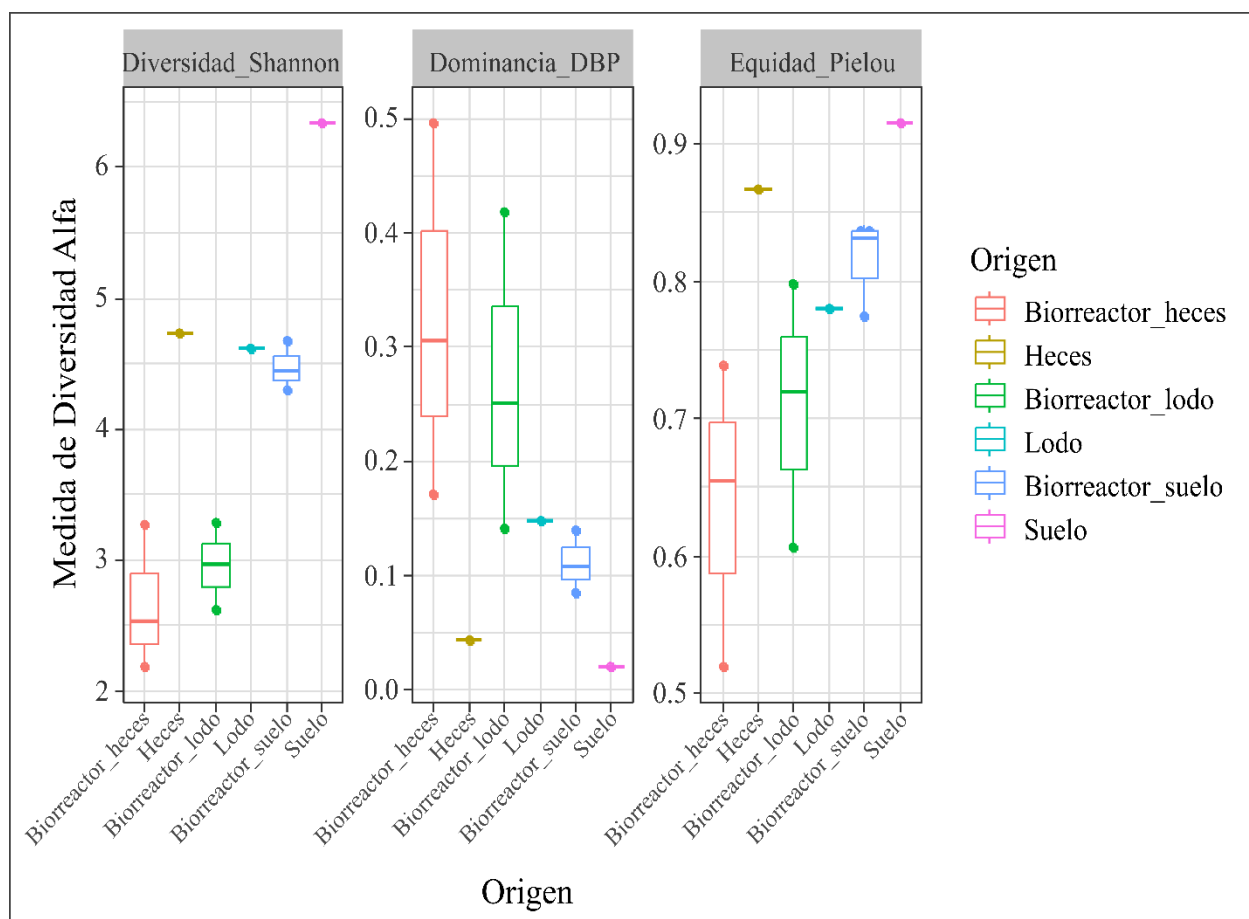
Figura 6. Géneros más abundantes para comunidad inicial de Heces y comunidades autoensambladas. A) Comunidad inicial Heces. B, C, D) Comunidades autoensambladas 'heces 1', 'heces 2' y 'heces 3'. *Fijadores de nitrógeno; 'Autótrofos.

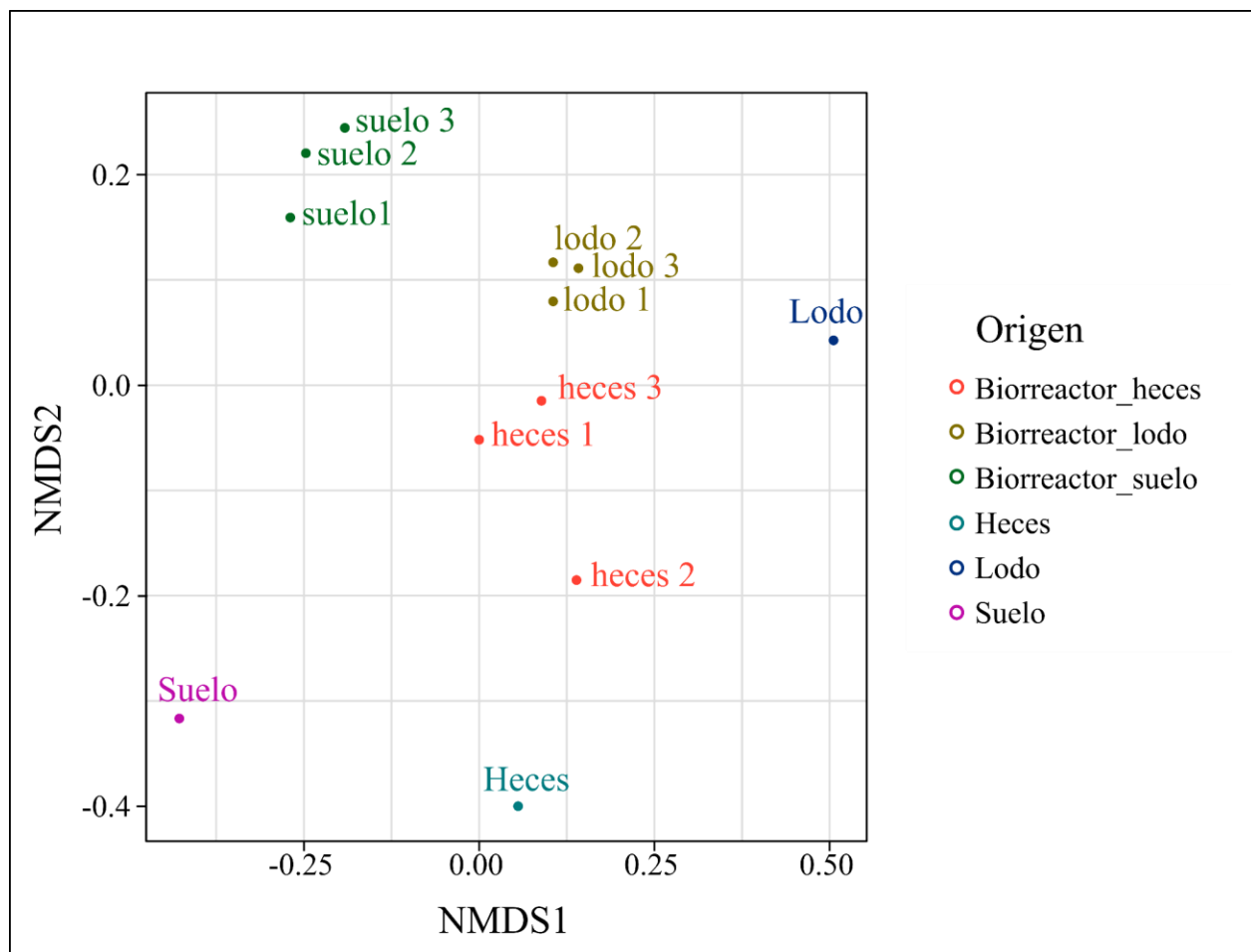
Figura 7. Rutas metabólicas con diferencias significativas entre las comunidades iniciales y las autoensambladas relacionadas al metabolismo del carbono y metano.

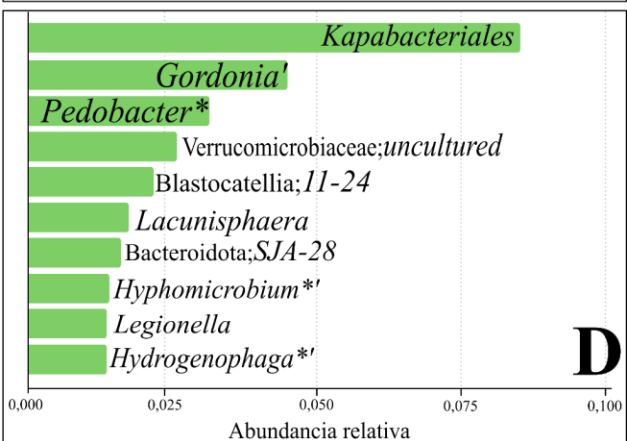
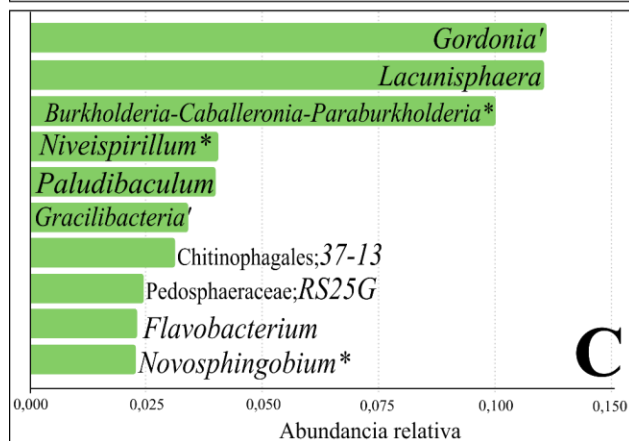
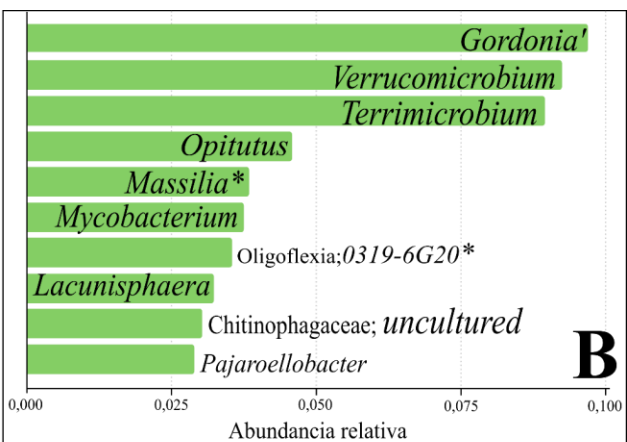
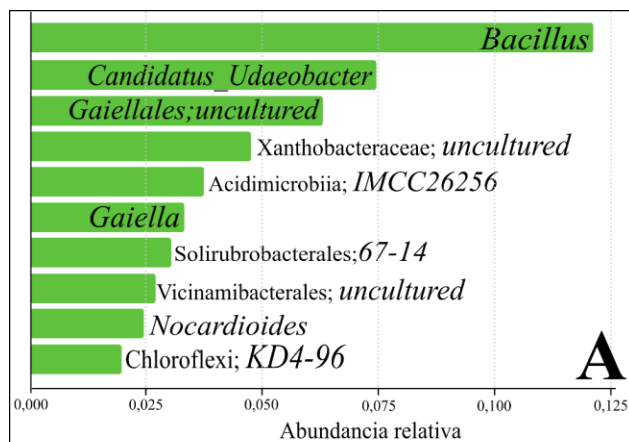
Figura 8. Rutas metabólicas con diferencias significativas entre las comunidades iniciales y las autoensambladas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y el sulfuro.

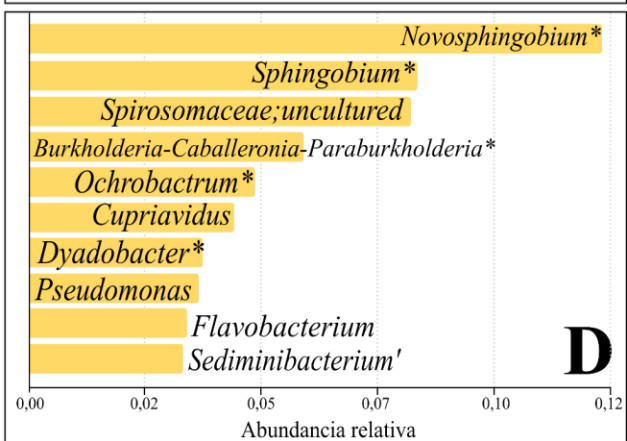
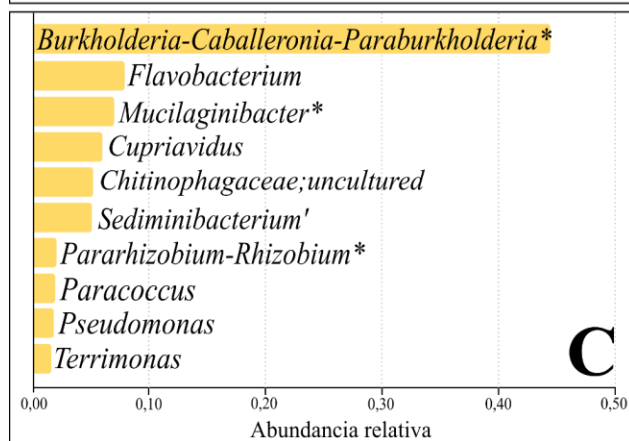
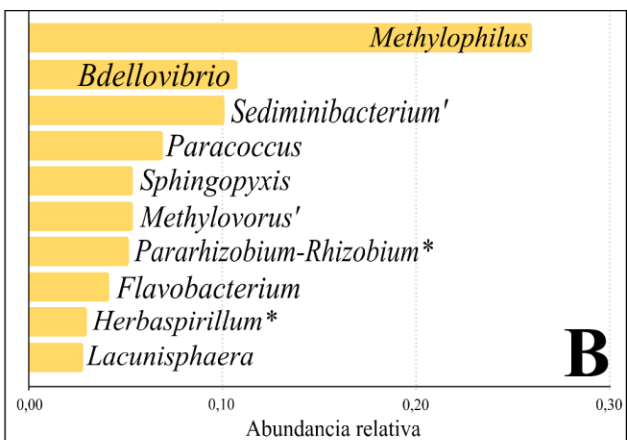
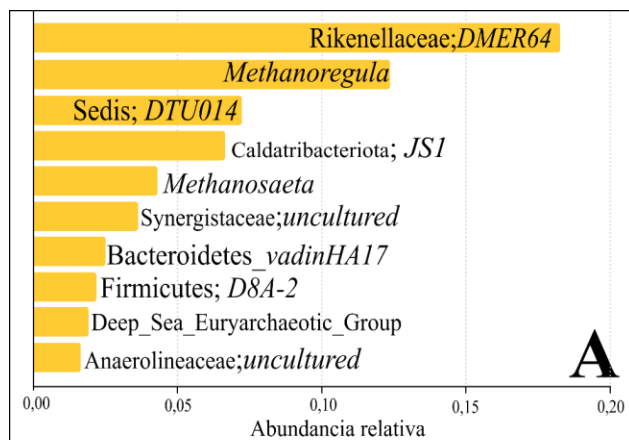
Fig 9. Ejemplo de la propuesta de organización dentro las comunidades ensambladas con énfasis en la función metabólica.

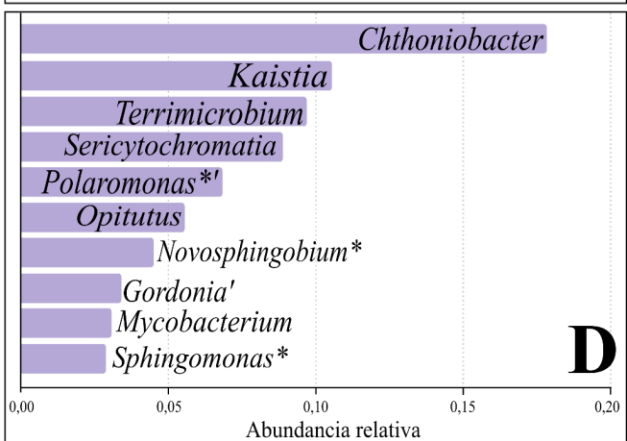
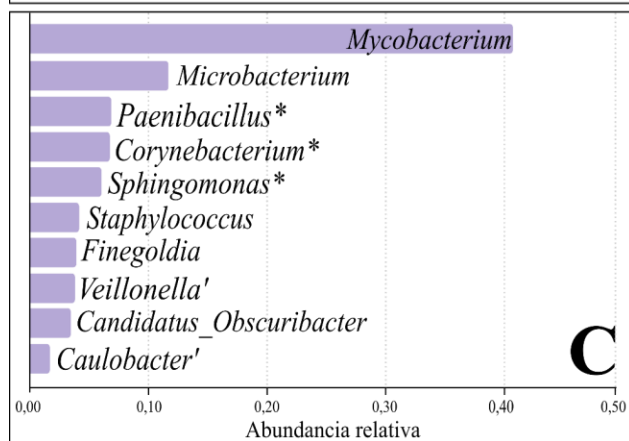
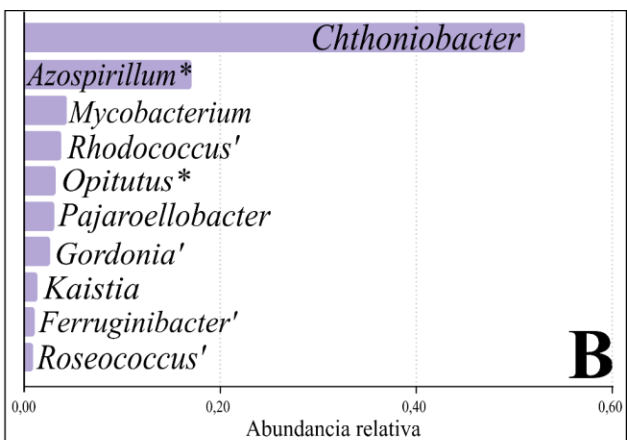
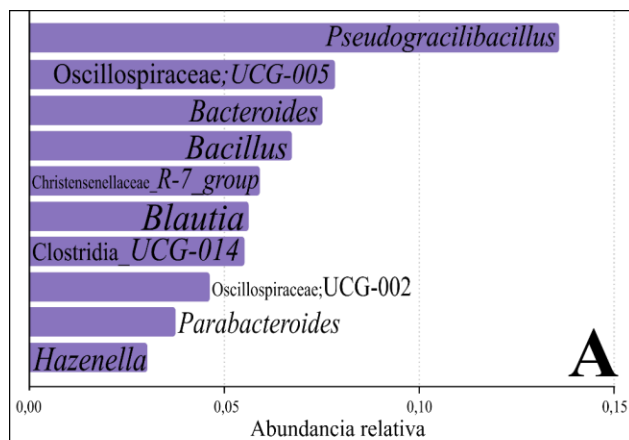


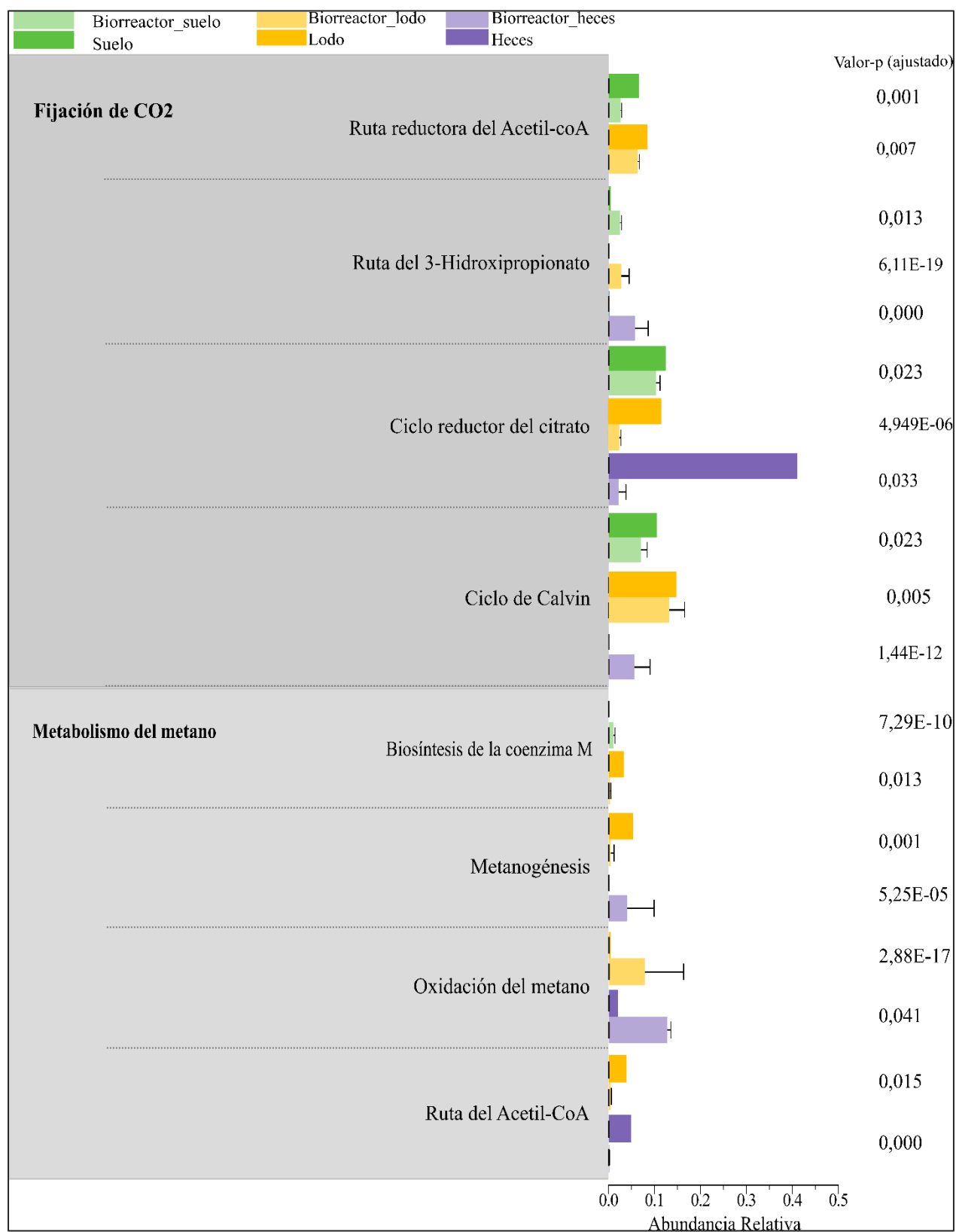


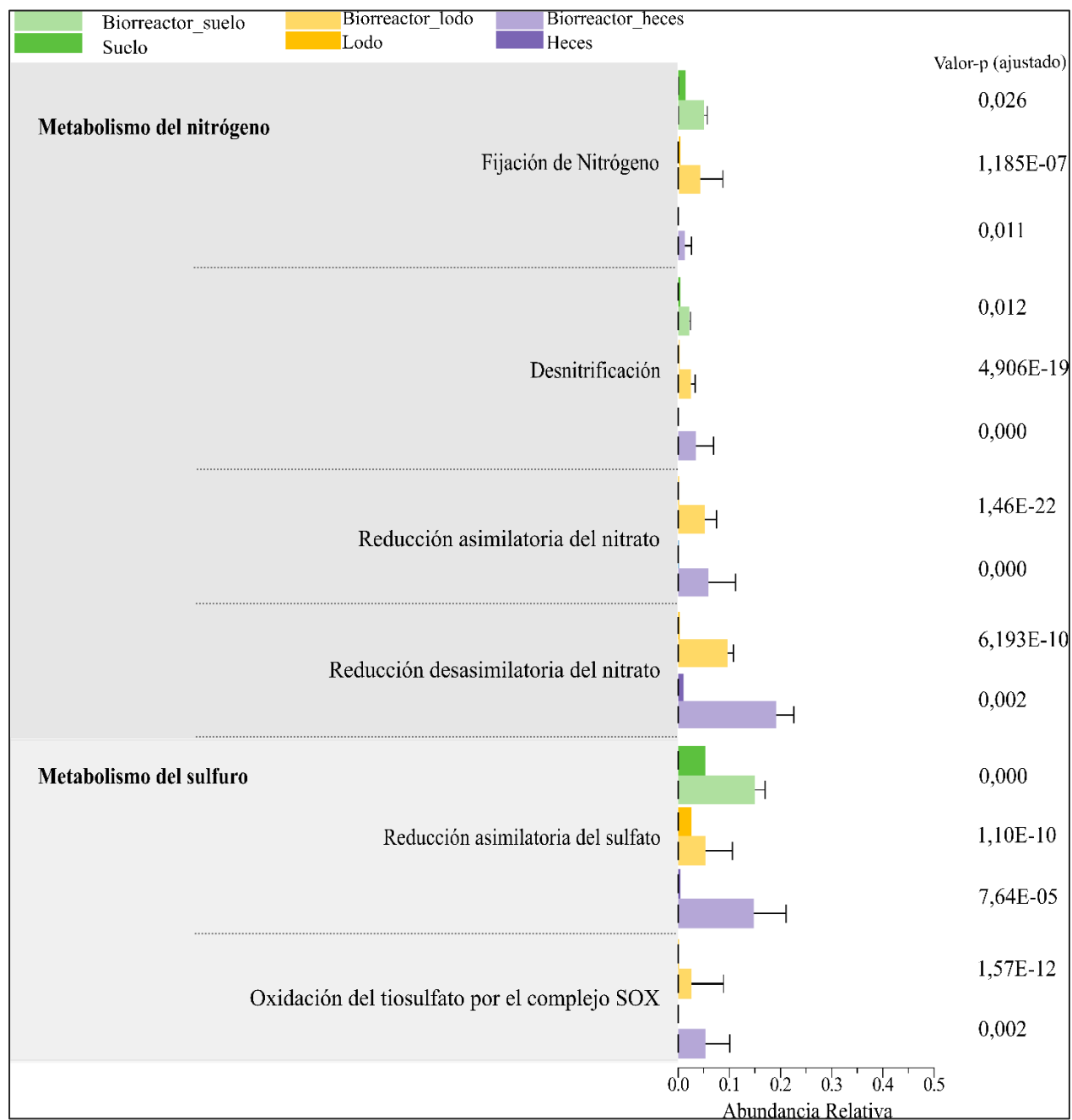


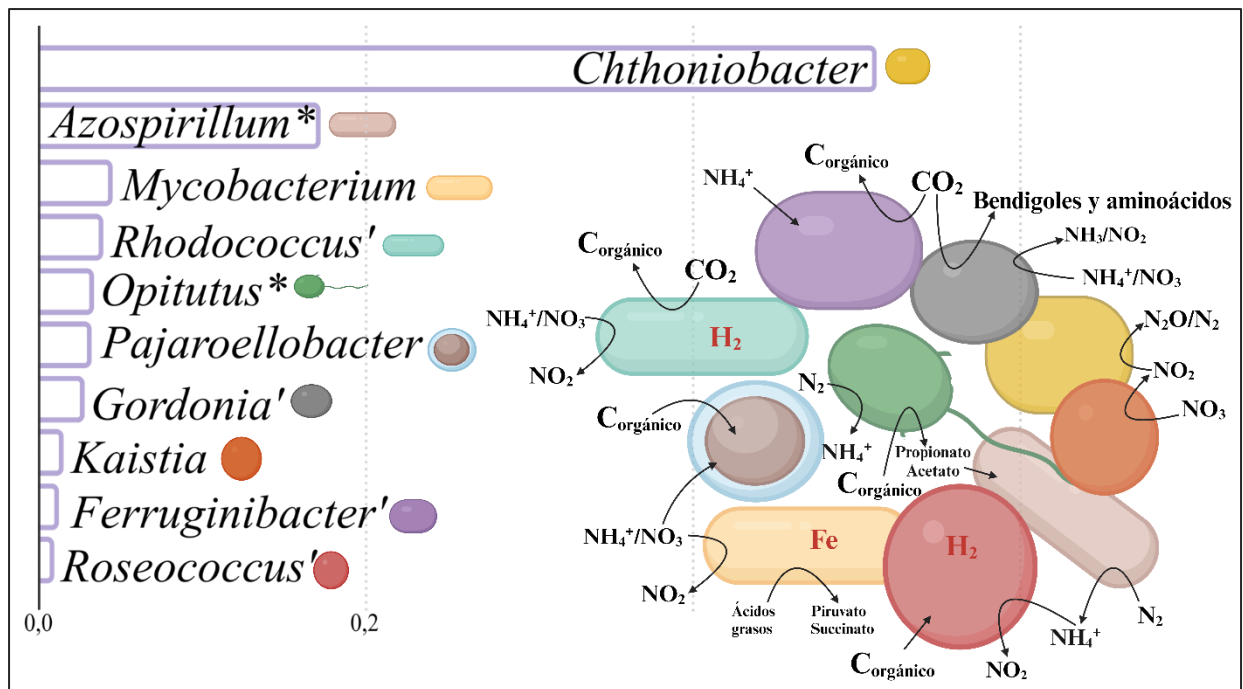












Apéndice A. Patrón de organización funcional encontrado en las comunidades autoensambladas
(representación de la comunidad heces 1).

taxonomía	abundancia relativa	
Chthoniobacteraceae;Chthoniobacter	0,51088427	
Azospirillaceae;Azospirillum	0,167015127	fijadores CO2
Nocardiaceae;Rhodococcus	0,038740622	fermentadores
Opitutaceae;Opitutus	0,031976387	
Polyangaceae;Pajaroellobacter	0,031115484	heterótrofos
Mycobacteriaceae;Mycobacterium	0,028286804	
Nocardiaceae;Gordonia	0,017095068	nitrificantes
Mycobacteriaceae;Mycobacterium	0,014881318	
Kaistia;Kaistia	0,014389374	fijadores N2
Acetobacteraceae;Roseococcus	0,008609027	desnitrificantes
Chitinophagaceae;Terrimonas	0,008363055	
Flavobacteriaceae;Flavobacterium	0,007502152	transformación del C
Sutterellaceae;AAP99	0,007133194	
Chitinophagaceae;Ferruginibacter	0,006887222	oxidadores de H2
Nocardioidaceae;Aeromicrobium	0,005534375	
Nocardiaceae;Gordonia	0,005165416	fotoheterótrofos
Rhodanobacteraceae;Dokdonella	0,004919444	
Caulobacteraceae;Caulobacter	0,004796458	
Chitinophagaceae;Helimonas	0,0044275	
Chitinophagaceae;Ferruginibacter	0,004304514	
Spirosomaceae;Dyadobacter	0,004304514	
Xanthobacteraceae;uncultured	0,004304514	
Sphingomonadaceae;Sphingomonas	0,004304514	
Alcaligenaceae;Achromobacter	0,004181527	
Nocardiaceae;Gordonia	0,003689583	
Azospirillaceae;Azospirillum	0,003689583	
Comamonadaceae;Variovorax	0,003074653	
Oscillospiraceae;UCG-005	0,00282868	
Comamonadaceae;Variovorax	0,00282868	
Chitinophagaceae;Filimonas	0,002705694	
Oxalobacteraceae;Masilia	0,002705694	
Caldatibacteriota;JS1	0,002582708	
Chitinophagaceae;Sediminibacterium	0,002336736	
Oscillospiraceae;UCG-002	0,00221375	
Comamonadaceae;Azohydromonas	0,00221375	
Bacillaceae;Bacillus	0,001967778	
Lachnospiraceae;Blautia	0,001844792	
Acetobacteraceae;Roseomonas	0,001844792	
Xanthomonadaceae;Pseudoxanthomonas	0,001721805	
Lachnospiraceae;Ruminococcus_torques_group	0,001598819	
Xanthobacteraceae;Pseudorhodoplanes	0,001598819	
Mycobacteriaceae;Mycobacterium	0,001475833	
Comamonadaceae;Polaromonas	0,001352847	
Solimonadaceae;uncultured	0,001352847	
Solirubrobacterales;67-14	0,001229861	
Sphingobacteriaceae;Pedobacter	0,001229861	
Xanthobacteraceae;Ancylobacter	0,001106875	
Bacillaceae;Bacillus	0,000983889	
Acidobacteriae;Paludibaculum	0,000860903	
Bdellovibrionaceae;Bdellovibrio	0,000860903	
Nocardiaceae;Gordonia	0,000737917	
Bacillaceae;Bacillus	0,000737917	
Clostridia_UCG-014	0,000737917	
Caulobacteraceae;Brevundimonas	0,000737917	
Rhodobacteraceae;Paracoccus	0,000737917	
Spirosomaceae;Emticicia	0,000614931	
Kapabacteriales;Kapabacteriales	0,000614931	
Ruminococcaceae;CAG-352	0,000614931	
Terrimicrobiaceae;Terrimicrobium	0,000614931	
Sericytochromatia;Sericytochromatia	0,000491944	
Sphingobacteriales;NS11-12_marine_group	0,000368958	
Clostridia_UCG-014	0,000368958	
Gemmatimonadaceae;Gemmatimonas	0,000368958	
Pedospiraceae;RS25G	0,000368958	