Aplicación de Tecnologías NGS para la elaboración de un fertilizante enriquecido con microorganismos PGPR.

Equipo de Investigación

Dr. David Correa Galeote. Investigador postdoctoral. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia Universidad de Granada.

Dr. Jesús González López. Catedrático de Universidad. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia Universidad de Granada.

Informe de progreso y resultados del proyecto

De acuerdo a la memoria del proyecto de investigación "Aplicación de Tecnologías NGS para la elaboración de un fertilizante enriquecido con microorganismos PGPR" suscrito entre la Universidad de Granada y la Azucarera del Guadalfeo se contempla como objetivo principal la obtención de un start-up enriquecido con microorganismos PGPR para la elaboración de un biofertilizante.

Objetivo parcial 1: Enriquecimiento en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en mezclas "LignoKaña más biol" para obtener un start-up que se empleará la producción industrial del biofertilizante

Como método para la obtención del inoculo inicial (start-up) de la producción industrial de fertilizante enriquecido en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (de sus siglas en inglés plant growth promoting rhizobacteria) se tomó una muestra de un "biol" mantenido durante 20 años para la producción de biogás. Como diluyente del biol se empleó un subproducto de la fermentación alcohólica de melaza de caña y remolacha azucarera (condesado soluble de melaza (CSM)). La adaptación progresiva de la comunidad procedente del biol al CMS se consiguió mediante la preparación de diluciones seriadas progresivas. Estas diluciones se mantuvieron durante 6 meses para evaluar la estabilidad del producto a lo largo del tiempo.

1.1. Cuantificación del número de copias del gen 16S rRNA

De cada una de las diluciones de biol se tomaron muestras al mes, a los 3 y a los 6 meses. El DNA se aisló mediante el kit de extracción Fast ADN spin kit for soil (MB Bio) en el agitador FastPrep (MB Bio). La abundancia total de bacterias en el ADN se cuantificó mediante PCR a tiempo real (qPCR) del gen 16S rRNA de *Bacteria*, de acuerdo a la metodología descrita por Correa-Galeote et al. (2013). Hay que indicar que el gen 16S rRNA es el marcador molecular más ampliamente utilizado para determinar el tamaño de la población bacteriana en técnicas independiente de cultivo (Haugland et al., 2010).

El análisis del número de copias de las distintas muestras de biol adicionado de CMS se muestra en la Figura 1. El valor medio del número de copias del gen 16S rRNA fue de 7,12 × 10^{11} copias/L. Por otra parte, a los 6 meses de incubación el contenido bacteriano aumentó respecto al número de copias inicial del gen 16S rRNA. Por tanto, independientemente del tipo de fraccionamiento, tras esta incubación existió una replicación bacteriana efectiva al aumentarse el número de copias y, por tanto una adaptación de la comunidad bacteriana procedente del biol al CMS.

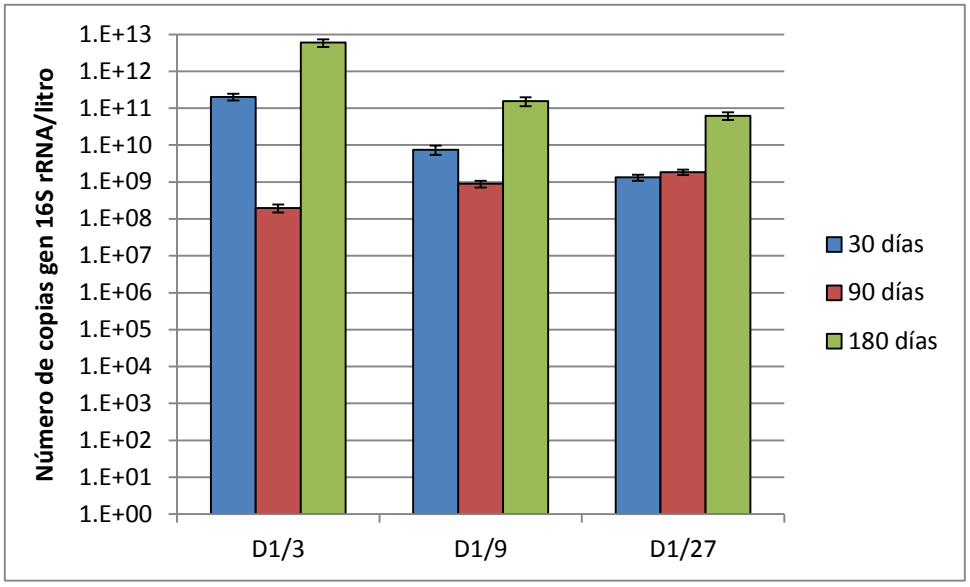

Figura 1. Número de copias del gen 16S rRNA por litro de producto determinado mediante qPCR a los 30, 90 y 180 días desde el correspondiente fraccionamiento. Se muestran valores medios ± SD (n=3) de tres muestras independientes.

1.2 Determinación de la biodiversidad bacteriana

La determinación de la biodiversidad bacteriana en las diferentes muestras de biol se determinó mediante secuenciación masiva empleándose la técnica Illumina y los primers 16S-ProV3V4-Fw/Rev (Takahashi et al., 2014). El procesamiento de las secuencias se realizó mediante el software Mothur v1.43.0 (Schloss et al. 2009). El número de secuencias totales fue de 901.452, que se agruparon en 323 géneros bacterianos diferentes. Por tanto, existe una gran diversidad microbiana en la comunidad. El número de secuencias y su abundancia relativa se muestra en la tabla S1. De los 323 géneros, 106 tuvieron una abundancia superior al 0,01 % (correspondientes a 51 familias bacterianas distintas) y fueron considerados para los subsiguientes análisis, lo que representó el 99,70 % del total de la comunidad. De los 106 géneros, 95 estuvieron presentes en cada una de las muestras, lo que indica que la maduración de la comunidad microbiana en el CMS es un proceso estable.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los 22 géneros mayoritarios (abundancia relativa > 0,5 %).

Género	Familia	Orden	Clase	Phylum
Lactobacillus	*Lactobacillaceae*	*Lactobacillales*	*Bacilli*	*Firmicutes*
Defluviitoga	*Petrotogaceae*	*Petrotogales*	*Thermotogae*	*Thermotogae*
Acholeplasma	*Acholeplasmataceae*	*Acholeplasmatales*	*Mollicutes*	*Tenericutes*
Pelotomaculum	*Peptococcaceae*	*Clostridiales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Proteiniphilum	*Dysgonomonadaceae*	*Bacteroidales*	*Bacteroidia*	*Bacteroidetes*
Caldicoprobacter	*Caldicoprobacteraceae*	*Clostridiales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Acetomicrobium	*Synergistaceae*	*Synergistales*	*Synergistia*	*Synergistetes*
Tepidanaerobacter	*Tepidanaerobacteraceae*	*Thermosediminibacterales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Syntrophaceticus	*Thermoanaerobacterales*	*Thermoanaerobacterales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Clostridium	*Clostridiaceae*	*Clostridiales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Gelria	*Familia III*	*Thermoanaerobacterales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Cryptanaerobacter	*Peptococcaceae*	*Clostridiales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Paenibacillus	*Paenibacillaceae*	*Bacillales*	*Bacilli*	*Firmicutes*
Breznakia	*Erysipelotrichaceae*	*Erysipelotrichales*	*Erysipelotrichia*	*Firmicutes*
Alkaliphilus	*Clostridiaceae*	*Clostridiales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Tepidimicrobium	*Tissierellaceae*	*Tissierellales*	*Tissierellia*	*Firmicutes*
Moorella	*Thermoanaerobacteraceae*	*Thermoanaerobacterales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Desulfonispora	*Peptococcaceae*	*Clostridiales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Lutaonella	*Flavobacteriaceae*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteriia*	*Bacteroidetes*
Maledivibacter	*Clostridiaceae*	*Clostridiales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Desulfothermobacter	*Thermoanaerobacteraceae*	*Thermoanaerobacterales*	*Clostridia*	*Firmicutes*
Urmitella	*Tissierellaceae*	*Tissierellales*	*Tissierellia*	*Firmicutes*

Por otra parte, hay que indicar que 22 géneros tuvieron una abundancia relativa superior al 0,5 % (géneros mayoritarios) que englobaron a su vez al 92,38 % de la población bacteriana que fueron (ordenados de mayor a menor abundancia): *Lactobacillus*, *Defluviitoga*, *Acholeplasma*, *Pelotomaculum*, *Proteiniphilum*, *Caldicoprobacter*, *Acetomicrobium*, *Tepidanaerobacter*, *Syntrophaceticus*, *Clostridium*, *Gelria*, *Cryptanaerobacter*, *Paenibacillus*, *Breznakia*, *Alkaliphilus*, *Tepidimicrobium*, *Moorella*, *Desulfonispora*, *Lutaonella*, *Maledivibacter*, *Desulfothermobacter* y *Urmitella*. La clasificación taxonómica de los géneros mayoritarios se muestra en la Tabla 1 y sus abundancias relativas en la Figura 2 y Tabla 2.

Aunque de forma general, no existieron grandes diferencias entre las abundancias relativas de los 22 géneros mayoritarios. De este modo, a los 90 días de incubación las abundancias relativas de los géneros *Lactobacillus*, *Acholeplasma*, *Pelotomaculum*, *Proteiniphilum*, *Syntrophaceticus*, *Clostridium*, *Gelria*, *Alkaliphilus*, *Moorella*, *Desulfonispora*, *Maledivibacter* y *Urmitella* fueron similares entre las 3 diluciones. Por otra parte, destaca el aumento de la abundancia del género *Lactobacillus* ya que aumenta desde el 0,05 % hasta el 19,14 % a los tres meses de incubación en la muestra diluida 1/3 manteniéndose estable a lo largo del resto del experimento. Teniendo en cuenta las características metabólicas de esta bacteria, su aumento es beneficioso para el desarrollo del producto biofertilizante ya que junto a su capacidad de fermentar diferentes azúcares es un potente controlador de la población fúngica

(Gerbaldo et al., 2012), por lo que podría actuar con un inhibidor de la contaminación de la muestra por hongos no deseados.

Por tanto, la dilución seriada en CSM de la comunidad microbiana que conforma el biol es un factor que modifica más la comunidad que lo producido por el tiempo de incubación.

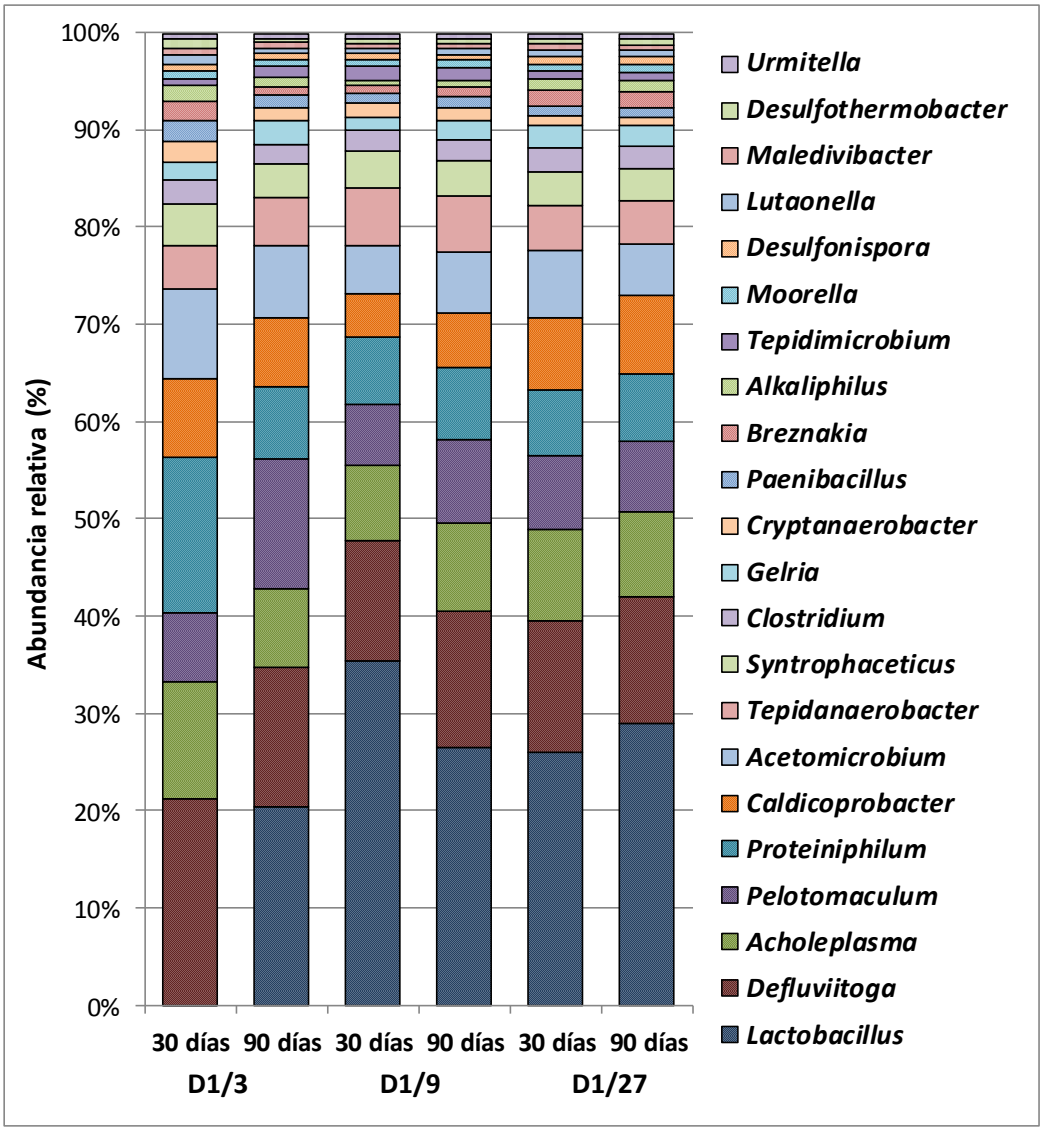

Figura 2. Abundancia relativa de los géneros mayoritarios (abundancia relativa > 0,5 %). Se muestran valores medios de tres muestras independientes.

Tabla 2. Abundancia relativa de los 22 mayoritarios en cada una de las muestras analizadas. Se muestran valores medios ± SD (n=3) de tres muestras independientes. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas entre los 30 y 90 días de incubación para una dilución dada de acuerdo al test de Fischer (P < 0,05). Letras minúsculas indican diferencias estadísticas entre las distintas diluciones para un tiempo de muestreo determinado de acuerdo al test Anova (P < 0,05).

Género bacteriano	D1/3 30 días	D1/3 90 días	D1/9 30 días	D1/9 90 días	D1/27 30 dias	D1/27 90 dias
Lactobacillus	0,05 ± 0,01 B c	19,14 ± 0,92 A a	37,49 ± 1,59 A a	21,47 ± 3,47 A a	23,80 ± 3,49 A b	26,51 ± 0,76 A a
Defluviitoga	18,96 ± 0,25 A a	13,38 ± 0,23 A a	11,59 ± 0,68 A b	13,74 ± 0,22 A a	12,44 ± 0,78 A b	12,01 ± 0,25 A b
Acholeplasma	10,88 ± 0,07 A a	7,52 ± 0,22 A a	6,70 ± 0,59 A b	8,46 ± 0,85 A a	8,55 ± 0,56 A b	7,91 ± 0,14 A a
Pelotomaculum	6,26 ± 0,22 A a	12,42 ± 0,09 A a	3,67 ± 0,15 A b	10,30 ± 0,14 A b	6,99 ± 0,14 A a	6,68 ± 0,16 A c
Proteiniphilum	14,37 ± 0,20 A a	6,88 ± 0,23 A a	6,33 ± 0,49 A b	6,72 ± 0,09 A a	6,11 ± 0,91 A b	6,31 ± 0,20 A a
Caldicoprobacter	7,15 ± 0,50 A a	6,62 ± 0,03 B ab	3,59 ± 0,16 A b	5,79 ± 0,36 A b	6,76 ± 0,24 A a	7,39 ± 0,35 A a
Acetomicrobium	8,37 ± 0,14 A a	6,93 ± 0,18 A a	3,98 ± 0,49 A c	6,32 ± 0,20 A a	6,43 ± 0,44 A b	4,90 ± 0,30 A b
Tepidanaerobacter	3,94 ± 0,11 A b	4,60 ± 0,03 A ab	6,00 ± 0,23 A a	5,09 ± 0,29 A a	4,13 ± 0,11 A b	4,02 ± 0,23 A b
Syntrophaceticus	3,83 ± 0,14 A a	3,29 ± 0,03 A a	3,81 ± 0,13 A ab	3,23 ± 0,20 A a	3,24 ± 0,13 A b	3,05 ± 0,08 A a
Clostridium	2,24 ± 0,04 A a	1,89 ± 0,02 A a	2,16 ± 0,04 A a	1,94 ± 0,12 A a	2,14 ± 0,13 A a	2,06 ± 0,07 A a
Gelria	1,63 ± 0,06 A b	2,25 ± 0,10 A a	0,96 ± 0,01 A c	2,07 ± 0,08 A a	2,13 ± 0,04 A a	1,91 ± 0,05 A a
Cryptanaerobacter	1,93 ± 0,07 A a	1,22 ± 0,02 A a	1,47 ± 0,06 A b	1,14 ± 0,05 A a	0,96 ± 0,02 A c	0,85 ± 0,01 A b
Paenibacillus	1,84 ± 0,07 A a	1,29 ± 0,08 A a	0,97 ± 0,01 B b	1,22 ± 0,09 A a	0,97 ± 0,06 A b	0,88 ± 0,04 A b
Breznakia	1,81 ± 0,02 A a	0,69 ± 0,05 A b	0,79 ± 0,03 A c	0,82 ± 0,07 A b	1,41 ± 0,10 A b	1,55 ± 0,04 A a
Alkaliphilus	1,54 ± 0,07 A a	0,92 ± 0,07 A a	0,40 ± 0,01 B c	0,78 ± 0,16 A a	1,10 ± 0,08 A b	1,06 ± 0,04 A a
Tepidimicrobium	0,51 ± 0,02 A c	1,05 ± 0,02 A b	1,57 ± 0,04 A a	1,18 ± 0,02 A a	0,68 ± 0,03 A b	0,65 ± 0,01 A c
Moorella	0,80 ± 0,01 A a	0,76 ± 0,01 A a	0,58 ± 0,05 A b	0,69 ± 0,05 A a	0,70 ± 0,05 A ab	0,77 ± 0,04 A a
Desulfonispora	0,48 ± 0,01 A b	0,58 ± 0,03 A a	0,58 ± 0,03 A ab	0,61 ± 0,06 A a	0,76 ± 0,07 A a	0,73 ± 0,05 A a
Lutaonella	1,00 ± 0,07 A a	0,46 ± 0,03 A b	0,54 ± 0,05 A b	0,56 ± 0,04 A ab	0,56 ± 0,09 A b	0,64 ± 0,03 A a
Maledivibacter	0,60 ± 0,05 A a	0,56 ± 0,02 A a	0,45 ± 0,03 A a	0,45 ± 0,04 A a	0,56 ± 0,03 A a	0,49 ± 0,04 A a
Desulfothermobacter	0,79 ± 0,04 A a	0,40 ± 0,01 A b	0,52 ± 0,06 A a	0,36 ± 0,01 B b	0,52 ± 0,08 A a	0,57 ± 0,05 A a
Urmitella	0,56 ± 0,02 A a	0,48 ± 0,03 A a	0,55 ± 0,03 A a	0,49 ± 0,05 A a	0,49 ± 0,03 A a	0,54 ± 0,07 A a

En general hay que destacar que ninguno de los géneros mayoritarios observados en el consorcio se ha descrito como patógenos de plantas, por lo que esta comunidad microbiana es útil para su empleo como un biofertilizante promotor del crecimiento vegetal sin comprometer la salud vegetal. También hay que destacar que dentro de estos 22 géneros mayoritarios, las poblaciones formadas por los géneros *Lactobacillus*, *Defluviitoga*, *Acholeplasma* y *Pelotomaculum* suponen alrededor del 50% del total de la comunidad microbiana.

Con el objetivo de profundizar más en el análisis de la similitud de las muestras a escala global se realizó un análisis estadístico multivariante (Non-metric multidimensional analysis) en el paquete informático PC-ORD. El análisis multivariante se muestra la Figura 3. Dicho análisis confirma que la estructura de la comunidad microbiana es estable en las distintas diluciones de CMS ya que no se altera significativamente el microbioma de la comunidad. No obstante, si podemos observar que la similitud entre las muestras fue mayor en aquellas con mayor contenido en CMS, especialmente para las muestras D1/27 que además fueron más similares en los dos tiempos analizados. Por tanto, una vez adaptada la comunidad bacteriana al CMS permanece estable en el tiempo.

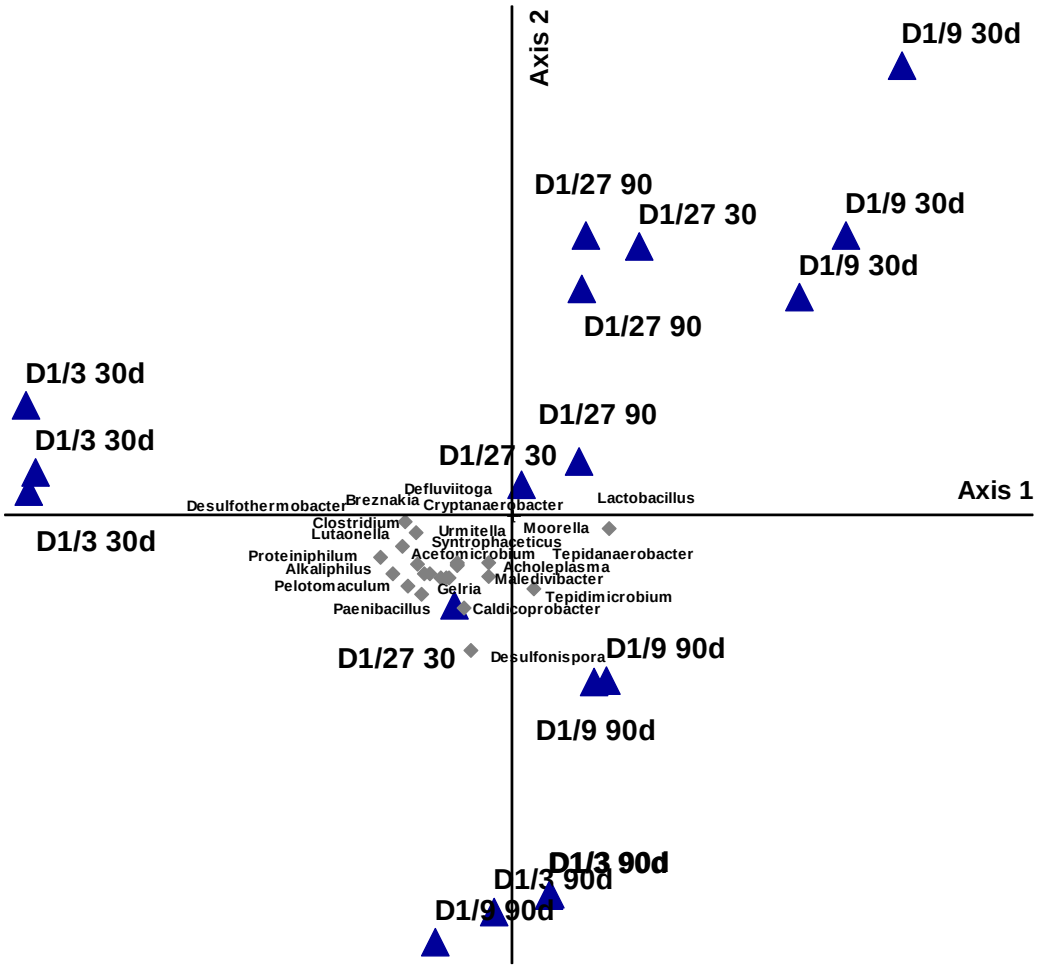

Figura 3. Análisis multidimensional no métrico de los principales género bacterianos (Abundancia relativa > 0,5%) en diferentes muestras de biol.

Por otra parte, se determinó el grado de correlación entre los distintos géneros mayoritarios y las familias bacterianas en las distintas muestras analizadas mediante la construcción de un mapa ilustrativo de la red de interacciones determinadas como el grado de correlación de Spearman (rho > 0.5) (Figuras 4 y 5). De acuerdo a esta representación, se observó una única red modular con un alto número de correlaciones entre los distintos componentes de las comunidades. A nivel de género se observaron 2.868 correlaciones estadísticamente significativas entre las abundancias de los 106 géneros (26% del total posible), de las cuales 2.280 fueron estadísticamente positivas y 588 negativas. Por tanto, la mayoría de las poblaciones microbianas produjeron efectos de sinergia en la globalidad del consorcio (correlaciones positivas) en la amplia red de correlaciones establecida entre los miembros de la comunidad, lo que indica las múltiples interdependencias que existen entre las distintas bacterianas procedentes del biol.

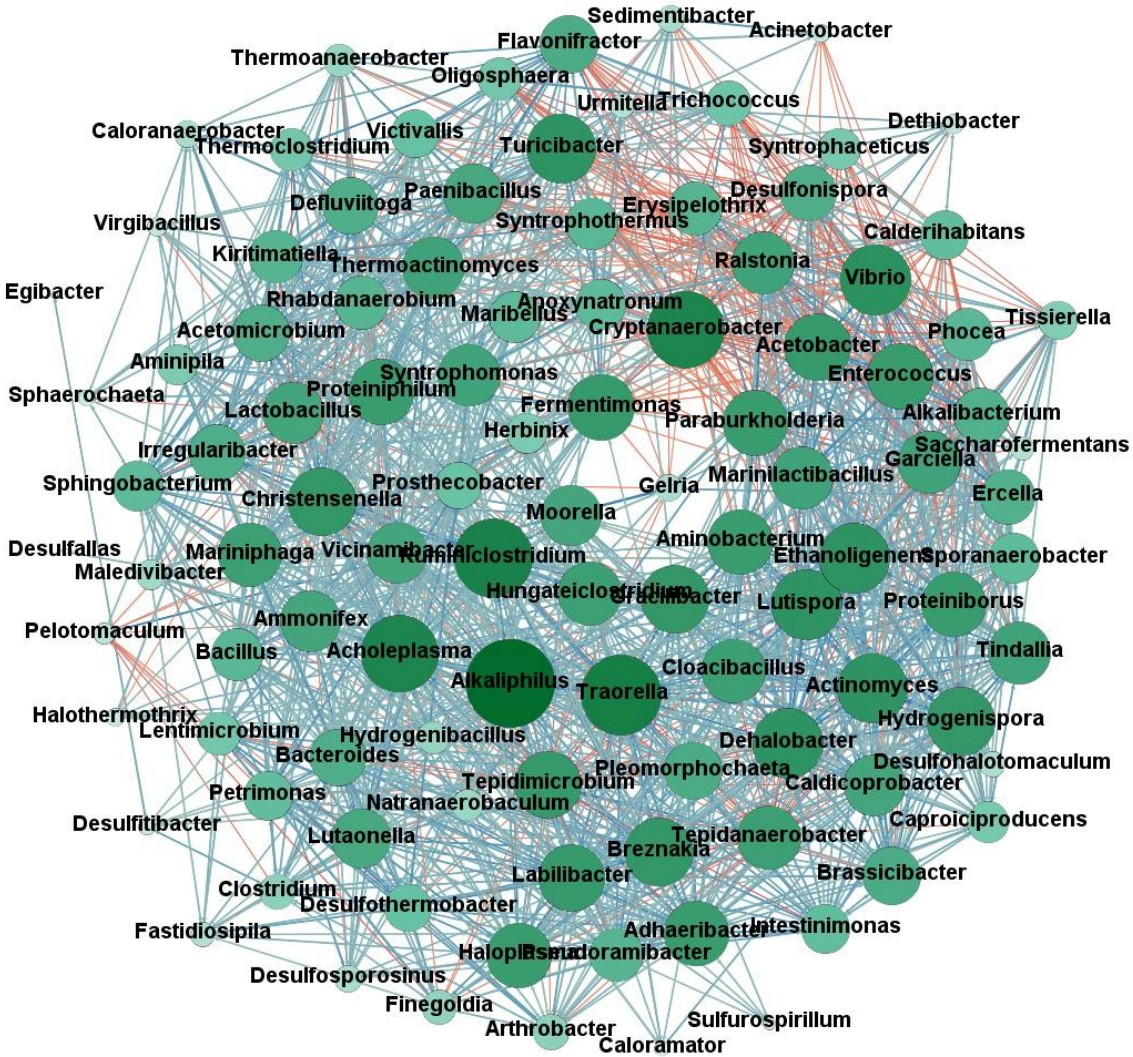

Figura 4. Red de interacciones entre los géneros con una abundancia superior al 0,01 % de las correlaciones de Spearman (|rho| > 0,5).

De forma similar, a nivel familia se encontraron un total de 840 correlaciones (32% del total posible), de las cuales 684 fueron estadísticamente positivas y 156 negativas.

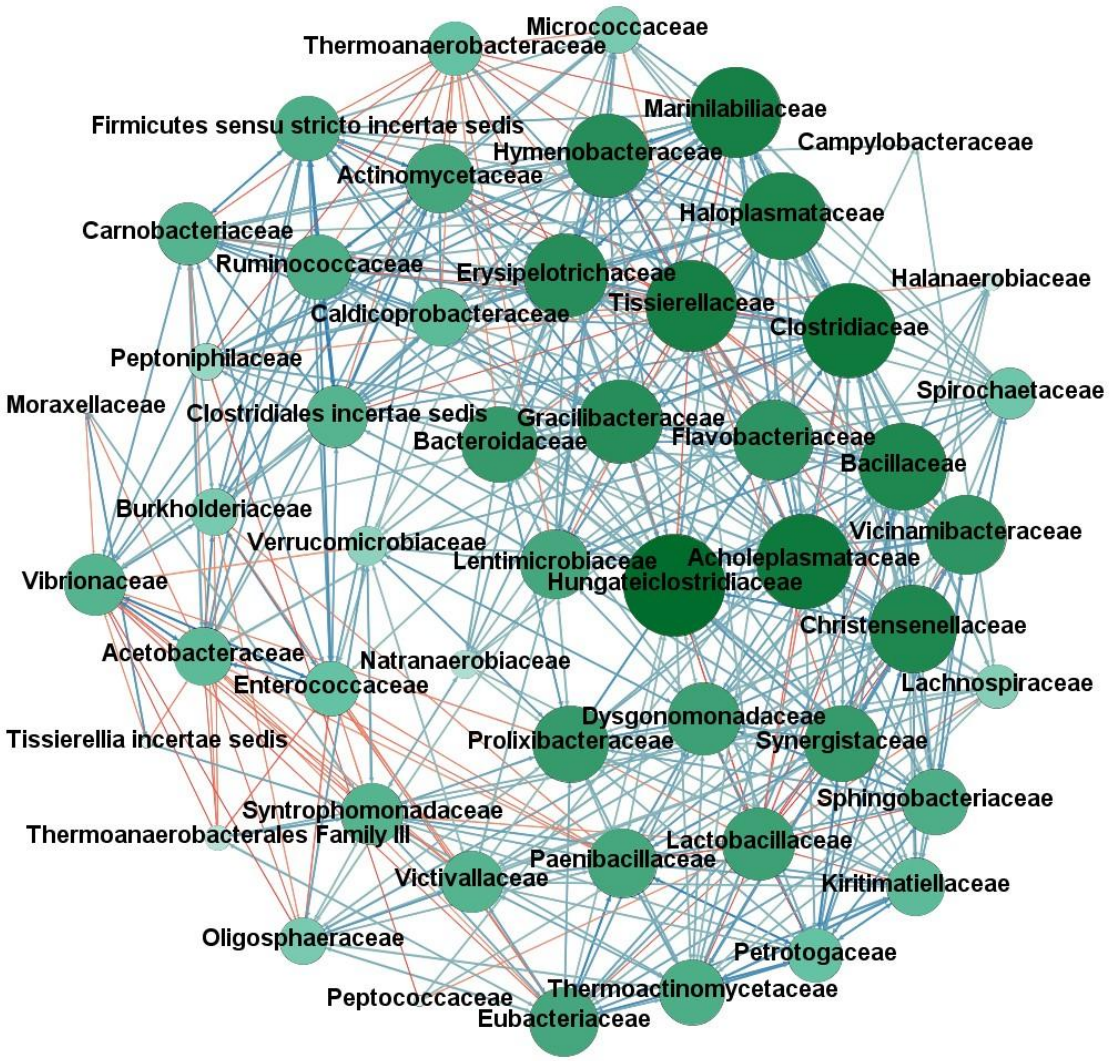

Figura 5. Red de interacciones entre las familias de los 106 géneros con una abundancia superior al 0,01 % de las correlaciones de Spearman (|rho| > 0,5).

Objetivo parcial 2: Comprender los mecanismos por los que estas bacterias mejorar el crecimiento vegetal.

2.1. Importancia del estudio de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal en rizobacterias

La rizosfera es la zona que rodea las raíces de las plantas, en la que existen relaciones complejas entre la planta, los microorganismos del suelo y el suelo mismo. Este suelo asociado a las raíces de las plantas experimenta cambios en sus propiedades físicas, químicas y biológicas que resultan en cambios en la diversidad microbiana, aumento en el número y actividad de microorganismos en este micro-ecosistema (Dutta y Podile 2010). Las bacterias PGPR son las bacterias que habitan en la zona de influencia de las plantas en suelo y que tienen el potencial de influir positiva y significativamente en el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos (Kloepper et al. 1980). Actualmente, la bioestimulación de estos microorganismos es una estrategia novedosa para aumentar o mantener la productividad de los cultivos agrícolas con menores costes de producción e impacto ambiental que el empleo de fertilizantes químicos. Es por ello, que a la hora de formular un biofertilizante deben de potenciarse mediante el aumento de la fijación de N, la solubilización de Fósforo (P), Potasio (K) y Zinc (Zn), producción de sideróforos que incrementan la absorción de Fe por las plantas, síntesis de fitohormonas beneficiosas (auxinas, ácido indol acético, citoquininas, giberilinas y ácido abscísico) y contribuir a la disminuir el estrés de las plantas mediante la reducción del contenido en etileno por la acción de la enzima ACC-desaminasa, control biológico de patógenos e inducción de la resistencia sistémica de las plantas (Gupta et al., 2015; Sahu et al., 2017).

Por otra parte, hay que indicar que la actividad metabólica de la microbiota del suelo implica la síntesis de una amplia variedad de productos químicos, de los cuales los compuestos orgánicos volátiles o VOCs (de sus siglas en inglés volatile organic compounds) comprenden una gran proporción (Kanchiswamy et al., 2015). Estos compuestos volátiles son moléculas de bajo peso molecular (< 300 g/mol) con bajo punto de evaporación (0.01 kPa a 20 °C) entre los que se incluyen más de 800 compuestos orgánicos e inorgánicos (Effmert et al., 2012), destacando alcoholes (metanol y etanol), ácidos orgánicos (acético, propiónico, butírico), cetonas (acetoina y 2,3-butanodiona) y otros compuestos nitrogenados (indol). Por otra parte, los compuestos inorgánicos más ampliamente citados como VOCs son el óxido nítico (NO), ácido sulfhídrico (H_2S), amonio (NH_4^+), dióxido de carbono (CO_2) y ácido cianhídrico (HCN). Recientemente, Heenan-Daly et al. (2019) han propuesto que los VOCs ejercen un papel nocivo para hongos y otros microorganismos perjudiciales en el desarrollo vegetal mientras que producen un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas (aumento germinación de semillas, tiempo y número de floración, y producción de frutos y semillas). Por tanto, la producción de VOCs mediante las bacterias de la rizosfera es un importante mecanismo de promoción del crecimiento vegetal.

2.2 Descripción de los principales géneros bacterianos

Para la cumplimentación de este objetivo se han determinado las propiedades PGPR descritas en la bibliografía científica de los 22 géneros con una abundancia superior al 0,5 %.

2.2.1 *Lactobacillus.*

El género *Lactobacillus* es uno de los probióticos más ampliamente utilizados en nutrición humana y animal (Hill et al., 2014). Este microorganismo tiene la capacidad de utilizar anaeróbicamente los azúcares mediante la fermentación ácido-lactica en ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, lo que da como resultado la disminución del pH y la inhibición de microorganismos indeseables, habiéndose utilizado ampliamente por el hombre como método de conservación de alimentos (Jia et al., 2020). Sin embargo, recientemente se ha señalado su potencial como PGPR, entre los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal destaca la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos indeseados tales como *Fusarium* o *Aspergillus* en cultivos de cereales principalmente mediante la producción de compuestos antimicrobianos además de inducir la resistencia sistémica de las plantas (Campagnollo et al., 2016; Lee et al., 2020). Por otra parte, se ha demostrado que la inoculación de este género en semillas de trigo produce un estímulo de la germinación y aumento del crecimiento de la planta en los primeros 7 días desde la germinación mediante la secreción de diferente ácidos orgánicos tales como el ácido succínico o láctico (Quattrini et al., 2018). Además, se ha demostrado que la inoculación de semillas de pepino con *Lactobacillus* produce un aumento del contenido en aminoácidos y de minerales (Ca, K, P y Mg) de las plantas, lo que mejora el perfil nutricional de las productos derivados de las mismas (Kang et al., 2015) y como PGPR capaz de reducir los efectos del estrés salino en plantas de lechuga (Lactuca sativa) y rábano (*Raphanus sativus*) (Hussein y Joo, 2018)

2.2.2. *Defluviitoga*.

El género *Defluviitoga* es un típico miembro de ecosistemas termófilos como son volcanes, fuentes termales o depósitos de petróleo, además es capaz de utilizar una gran cantidad diversidad de compuesto carbonados (Maus et al., 2016). Es por tanto, un importante degradador de la materia orgánica capaz de metabolizar compuestos difícilmente asimilables (pectina, quitina o celulosa) hasta productos menos complejos (acetato, lactato o etanol) (Conners et al., 2016), siendo clave en la hidrólisis de los compuestos carbonados complejos (Zhang et al., 2020) y por tanto beneficioso en la fermentación del CMS que es rico en este tipo de compuestos. Por otra parte, se ha descrito como una bacteria rizosférica de plantas de la familia *Poacea* (*Seratia*) (Chaluvadi y Bennetzen, 2018), si bien, se desconocen las propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Aunque su capacidad de producir ácidos grasos orgánicos se perfila como una importante característica promotora del crecimiento vegetal mediante la estimulación del desarrollo vegetal y la activación de la respuesta sistémica de las plantas (Heenan-Daly et al., 2019), además, de incrementar la población bacteriana del suelo (Yuan et al., 2017).

2.2.3. *Acholeplasma.*

Los miembros del género *Acholeplasma* son microorganismos con pocos requerimientos nutricionales aislados de diversos ambientes acuáticos (Windsor et al., 2010). Su estilo de vida se ha propuesto como saprofítico comensal (Kube et al., 2014), aunque existen ciertas discrepancias en su estilo de vida. Su presencia en la rizosfera de diversas especies vegetales está bien documentado habiéndose descrito de forma muy abundante en la rizosfera de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) (Mitter et al., 2017) y de centeno (*Secale cereale*) (Blain et al., 2017), además algunas especies fueron aisladas de brócoli y de la palmera cocotera (Kube et al., 2014) pero se desconocen los putativos mecanismos por lo que es tan frecuentemente encontrada en la rizosfera.

2.2.4 *Pelotomaculum.*

La principal característica metabólica del género *Pelotomaculum* es la capacidad de producir acetato, H_2 o CO_2 a partir de fermentar ácidos grasos de cadena corta (propionato, butirato, lactato) y alcoholes (propanol y etanol) generados previamente por otros microorganismos en una primera fase de la degradación de moléculas orgánicas complejas (Kosaka et al., 2008). Es por tanto, un microorganismo esencial en el consorcio microbiano estudiado ya que es capaz de metabolizar los compuestos intermediarios más complejos que se producen en las primeras etapas de la biodegradación de la materia orgánica tras la fermentación inicial de algunos microorganismos tales como *Defluviitoga*, *Clostridium* y *Lactobacillus*. Por otra parte, se ha descrito como una bacteria de la rizosfera del cacahuete (*Arachis hypogaea*) (Haldar et al., 2011), además, se ha identificado en suelos agrícolas que emplearon como agentes biológicos para la desinfección plantas de *Brassica* (Mowlick et al., 2013) sin asociar a alguno de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal propuestos a excepción de la producción de VOCs. Igualmente es importante destacar la capacidad de este microorganismo para descomponer productos xenobióticos del suelo altamente contaminantes en productos menos nocivos (Bhargava et al., 2017).

2.2.5 *Proteiniphilum.*

Este género se agrupa dentro de las bacterias capaces de fermentar piruvato y otros azúcares hasta acetato, propionato, CO_2 e H_2, y por tanto, es una bacteria que interviene el metabolismo intermediario de la degradación de la materia orgánica compleja (Hu et al., 2020) al igual que *Pelotomaculum*. Además, produce enzimas extracelulares capaces de degradar compuestos orgánicos complejos tales como el xilano, almidón, celulosa, pectina y quitina y está implicado en la degradación de sustratos enriquecidos en proteínas mediante la acción de proteasas intra y extracelulares (Chen et al., 2005). Por lo tanto, esta bacteria es un candidato prometedor para el desarrollo de inoculantes que intervengan en la mejora de la descomposición de la biomasa y en la producción de ácidos orgánicos volátiles (Tomazetto et al., 2018). Es una bacteria típica de ambientes productores de biogás aunque también forma parte de la microbiota del suelo (Wolińska et al., 2017). Esta bacteria se ha asociado con la elaboración de licores tradicionales chinos (Liu et al., 2017), pero todavía no ha sido aislada de la rizosfera de las plantas que se en la elaboración de este producto.

2.2.6 *Caldicoprobacter.*

Este género es un potente degradador capaz de catabolizar proteínas de difícil metabolización como es el caso de la queratina (Gimenes et al., 2018) y compuestos carbonados (lignocelulosa) (Widyasti et al., 2018). La presencia de esta bacteria se ha demostrado para la rizosfera de plantas de trigo cultivadas en suelos tratados con compuestos nitrogenados orgánicos (Kavamura et al., 2018) y en suelos cultivados con tomate (Lee et al., 2017). Aunque se desconocen los mecanismos por los que esta bacteria podría actuar como PGPR, las productos que genera durante su metabolismo terminan en la producción de diferentes VOCs (acetato, lactato, CO_2 y H_2) (Bouanane-Darenfed et al., 2013), por lo que estos compuestos serían los responsables de su potencial actividad PGPR. Por otra parte, se ha determinado que una elevada presencia de esta bacteria en compost aumenta el contenido en nutrientes del mismo (N, K y P) (Li et al., 2019)

2.2.7 *Acetomicrobium.*

Esta bacteria es capaz de fermentar diferentes azúcares hasta H_2, produciendo acetato y CO_2 como co-producto de la reacción (Cook et al., 2018) y se ha aislado de muestras de lodos de depuradora (Hania et al., 2016). Además, diferentes autores han señalado su actividad proteolítica (Beraud-Martínez et al., 2020) y degradadora de ésteres (Kumagai et al., 2018). El

estudio de la microbiota de digestores anaerobios que emplearon como sustrato bagazo de caña de azúcar indicaron que este microorganismo fue el mayoritario, lo que indica una buena adaptación al CMS al compartir origen (Soares et al., 2020). Se ha detectado en compost obtenidos a partir de hojas de bambú cuya aplicación a plantas de pepino mejoró la resistencia del cultivo a infecciones por patógenos (You et al., 2019). Aunque su presencia en suelos no se descrito, su capacidad de fermentar azúcares produciendo VOCs, sus capacidades hidrolíticas y la actividad de biocontrol lo sitúan como un buen candidato para ser empleado en la formulación de mezclas bacterianas empleando como vehiculo CMS.

2.2.8 *Tepidanaerobacter.*

Tepidanaerobacter es capaz de fermentar una gran variedad de azúcares y compuestos proteicos y además es una oxidadora del acetato hasta CO_2 y H_2 (Sekiguchi et al., 2006). Esta bacteria se ha encontrado en compost producidos a partir de restos de maíz y arroz (Shikata et al., 2018). Es por tanto, una bacteria importante en la degradación del carbono (Das et al., 2017). Se ha descrito en la rizosfera de plantas halotolerantes (*Cressa cretica*) (Etemadi et al., 2020) y por tanto esta bacteria podría ejercer un papel beneficioso sobre el crecimiento de plantas sometidas a estrés salino si bien se desconocen los mecanismos por lo que esta planta podría actuar en condiciones de salina como PGPR, aunque la producción de VOCs se perfila como un importante mecanismo.

2.2.9. *Syntrophaceticus.*

Esta bacteria presenta unas características metabólicas similares a las de *Tepidanaerobacter*, es decir fermentar diferentes sustratos y de manera específica la del acetato (Westerholm et al., 2011). Además es capaz de degradar compuestos recalcitrantes fenólicos y ftalatos (Narihiro y Kamagata, 2017). Frecuentemente se encuentra en los digestatos provenientes de desechos alimentarios (de Jonge et al., 2020). Además, se ha encontrado en suelos agrícolas en los que se empleó como enmienda orgánica un digestato proveniente de una planta de producción de biogás (Wolters et al., 2018) y estiércol de cerdo (Sui et al., 2018). Hasta la fecha no se ha descrito ningún mecanismo promotor del crecimiento vegetal a excepción de la generación de VOCs.

2.2.10 *Clostridium.*

Al género *Clostridium* pertenecen un gran número de microorganismos anaerobios formadores de esporas caracteriza por presentar una gran diversidad biocatalítica (Wu et al., 2020), si bien es un grupo heterólogo compuesto por cerca de 200 grupos bacterianos, siendo la mayoría bacterias saprofitas inocuas para los seres vivos aunque existen algunos géneros patógenos para los humanos (Pahalagedara et al., 2020). De acuerdo a su clasificación a nivel de especie, los miembros del género *Clostridium* encontrados fueron *C. isatidis* y *C. acetireducens*. *C. isatidis* se aisló inicialmente en el proceso de producción tradicional del índigo mediante la acción de una enzima azoreductasa, característica específica de esta especie (Aino et al., 2018). *C. acetireducens* fue aislado en el proceso de fabricación industrial de almidón y es capaz de producir isovalerato (incluido como VOCs) y presenta la maquinaria genética necesaria para la producción de polihidroxialcanoatos (Flüchter et al., 2016), además se ha encontrado en suelos cultivados con arroz (Li et al., 2019). De entre las capacidades del género *Clostridium*, destaca la de ser la bacteria con mayor capacidad de degradar la pared celular de las plantas mediante la acción de un complejo extracelular multienzimático denominado celulosoma (Tachaapaikoon et al., 2012). El género *Clostridium* se ha descrito como PGPR (Martínez et al., 2015) y entre las distintas actividades destacan la solubilización de P, producción de sideróforos, actividad ACC-deaminasa (Rani et al., 2012) y la producción de

antibióticos en condiciones similares a las del suelo (Pahalagedara et al., 2020). Además, algunas cepas dentro del género presentan la enzima nitrogenasa en su genoma (*C. pasteurianum* strain W5 y *C. butyricum* S3) (Therien et al., 2013; Zhou et al., 2020) por tanto contribuye a la fijación de N en el suelo. Esta bacteria se ha encontrado en suelos rizosféricos sembrados con arroz (Hernández et al., 2015), patata (Kõiv et al., 2015) y la leguminosa forrajera Vicia sativa (Borozan et al., 2016).

2.2.11 *Gelria.*

El género *Gelria* tiene la capacidad de degradar compuestos proteicos y, además, se ha descrito como una bacteria capaz de fermentar tanto el glutamato como la celulosa hasta ácido propiónico o propanoico, amonio, CO_2 y H_2 (Plugge et al., 2002; Plugge, 2015). Esta bacteria se ha descrito en suelos rizosféricos de cacahuete (Li et al., 2014), césped (*Lolium perenne*) (Lagos et al., 2014) y arroz (Tang et al., 2020) aunque se desconocen otros mecanismos promotores del crecimiento vegetal por los que esta bacteria estaría frecuentemente asociada a los suelos agrícolas.

2.2.12 *Cryptanaerobacter.*

Cryptanaerobacter es una bacteria que transforma el fenol, que produce tanto problemas de contaminación en el medio ambiente como en la salud humana, hasta el ácido benzoico menos perjudicial (Juteau et al., 2005). Originalmente fue aislada de sedimentos de pantano pero también se ha encontrado en sedimentos marinos (Ozuolmez et al., 2020). Aunque esta bacteria se ha descrito en suelos de arrozal anóxicos debido al encharcamiento (Liu y Conrad, 2017; He et al., 2019), se desconoce el papel potencial promotor del crecimiento vegetal que este género bacteriano puede estar realizando en estos suelos.

2.2.13 *Paenibacillus.*

El género *Paenibacillus* contiene diferentes especies que estimulan el crecimiento vegetal, incluyendo árboles (*Populus*) y cultivos herbáceos (maíz, calabaza y arroz, entre otras). Su capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos está bien establecida en la literatura científica. Esta bacteria puede solubilizar P a través de la producción de ácido glucónico lo que resulta en un aumento de la biodisponibiliad del P insoluble (Xie et al., 2016). De manera similar también favorece la solubilización del K (Ahmad et al., 2016). Igualmente, es capaz de promover la absorción de Fe por parte de las plantas mediante la producción de sideróforos quelantes del Fe^{3+} (Wen et al., 2011). Además, es capaz de producir la auxinas (Ácido indol-3-acético) que interviene en la división celular de las células vegetales mediante su estimulación (Xin et al., 2017) y actividad ACC-deaminasa (Dixit et al., 2016). Por otra parte, algunas cepas son capaces de expresar los genes que codifican la nitrogenasa contribuyendo a la fijación de N atmosférico (Tong et al., 2020). Si bien, la característica PPGR más notable de *Paenibacillus* es la capacidad de biocontrol. Dos mecanismos se han propuesto para ello en esta bacteria: la inducción de los propios mecanismos de resistencia de la planta (Phi et al., 2010) y la producción de sustancias biocidas que neutralizan diferentes fitopatógenos e insectos herbívoros (Lorentz et al., 2009). Además, su capacidad de tolerar diferentes fungicidas y herbicidas indica la posibilidad de utilizar estos microorganismos en combinación con las soluciones de control existentes (Singh et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito como una potente bacteria celulolítica capaz de degradar la celulosa del bagazo de caña de azúcar, paja de arroz o almidón de maíz (Bohra et al., 2020).

2.2.14 *Breznakia.*

Esta bacteria perteneciente a la familia *Erysipelotrichaceae* en la que se incluye una amplia gama de bacterias asociadas a la microbiota intestinal (Kanno et al., 2015). El género *Breznakia* fue aislado recientemente del tracto intestinal de insectos y su principal característica metabólica es la fermentación de la glucosa y otros hidratos de carbono hasta ácido fórmico, acético y etanol (Tegtmeier et al., 2016). Debido a su reciente validación como géneros bacterianos se desconoce en gran parte las capacidades metabólicas de estas bacterias a excepción de la producción de VOCs.

2.2.15 *Alkaliphilus*

El género *Alkaliphilus* se caracteriza por poseer un metabolismo basado exclusivamente en la fermentación de compuestos proteicos complejos (Takai et al., 2001) y, además, por su capacidad de crecimiento en ambientes con pHs alcalinos extremos de hasta 12.5 (Hwang et al., 2016). Algunas cepas de este género son capaces de reducir el Fe^{3+} hasta Fe^{2+} (Roh et al., 2007), lo que favorece la biodisponibilidad del Fe en el suelo. Esta bacteria se ha aislado de un consorcio celulolítico de sedimentos lacustres (Zhilina et al., 2009). Además, es capaz de producir PHAs, lo que sitúa este microorganismo como prometedor en la producción alternativas ecológicas al plástico convencional (Pramanik et al., 2014) y presenta la maquinaría genética necesaria para tolerar elevadas concentraciones de Arsénico (Fu et al., 2009). Aunque se desconoce sus propiedades como PGPR se ha descrito en suelos rizosféricos (Pramanik et al., 2014).

2.2.16 *Tepidimicrobium*

Al igual que el género *Alkaliphilus,* esta bacteria presenta un metabolismo energético centrado en la degradación de productos proteicos (Slobodkin et al., 2006). Si bien, algunas cepas presentan un complejo extracelular multienzimático similar al celulosoma descrito para el género *Clostridium* capaz de hidrolizar xilano (el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza) (Phitsuwan et al., 2015). Además, todas las especies dentro de este género se han descrito como productoras de ácidos grasos volátiles (butirato, acetato y propionato) (Kim et al., 2018), moléculas que se incluyen como potentes VOCs. Esta bacteria se ha descrito como mayoritaria en compost de maíz y arroz (Shikata et al., 2018; Ma et al., 2020) y sedimentos de ríos (Slobodkin et al., 2006), sin embargo hasta la fecha no se ha descrito en la rizosfera de ningún vegetal.

2.2.17 *Moorella*

Este microorganismo se ha propuesto como modelo del grupo de bacterias acetogénicas las cuales son capaces de transformar el CO_2 y el H_2 hasta ácido acético lo que contribuye a disminuir la presión parcial de H_2 que se genera durante la biodegradación de los compuestos orgánicos (Pierce et al., 2008). Una excesiva acumulación de H_2 puede inhibir la actividad degradadora de la comunidad al producir se un desequilibrio energético por lo que este género al reducir la presión parcial de H_2 favorece el buen funcionamiento general del consorcio. Además, esta acetogénesis incrementa la concentración de acetato que actúa como un nutriente beneficioso para el resto de la comunidad. Por otra parte, esta bacteria es capaz de metabolizar multitud de compuestos carbonados como son la xilosa, glucosa, lactato, propanol y etanol (Seifritz et al., 1999) y de hidrolizar biomasa lignocelulósica compleja (paja de trigo, residuos forestales, y restos de caña de azúcar) (Ehsanipour et al., 2016). Por todo ello, la presencia de este género es esencial para el buen funcionamiento del consorcio bacteriano. Por otra parte, se ha descrito como una bacteria capaz de disminuir la concentración de Cadmio en el suelo mediante su inmovilización (Halim et al., 2020). Aunque

esta bacteria se ha aislado de suelos de jardín (Gößner et al., 1999) se desconoce su potencial como PGPR.

2.2.18 *Desulfonispora.*

Este género bacteriano, también denominado *Desulfonosporus*, pertenece al grupo de las bacterias reductoras del sulfato (Sugai et al., 2014). En este proceso se produce energía metabólica mediante el acoplamiento de la oxidación del H_2 y la reducción del sulfato hasta producir sulfuro de hidrógeno. Por tanto, las bacterias reductoras del sulfato disminuyen la presión parcial de H_2 que se produce durante la fermentación de la biomasa en el ecosistema, favoreciéndose de ese modo la biodegradación de la biomasa (Zhou et al., 2011). Esta bacteria se ha identificados en diferentes estiércoles tanto de cerdo como de pollo (Song et al., 2014) y desechos vegetales (Yagi et al., 2011) y de forma natural en suelos de la Antártida (Ramos et al., 2019) y en pastizales alpinos (Zhang et al., 2014). Además, se ha detectado en sedimentos unidos al rizoma sumergido de plantas de carrizo (*Phragmites karka*) en donde esta bacteria tiene un papel importante en la vinculación de los ciclos biogeoquímicos del el carbono, el azufre y el nitrógeno en entornos anaeróbicos (Behera et al., 2018).

2.2.19 *Lutaonella*

Esta bacteria se aisló por primera vez en sedimentos marinos y se ha reportado como un microorganismo capaz de utilizar una amplia diversidad de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos (Arun et al., 2009). Además, se ha descrito con un género presente en la microbiota que interviene en el proceso de digestión anaerobia de la biomasa del género *Pennisetum* (familia de las gramíneas) en el que se empleó como inóculo inicial un cultivo enriquecido en bacterias degradadoras del propionato (Lianhua et al., 2018) y en un fermentador en estado sólido de plantas de arroz (Guang et al., 2011). En gran medida se desconoce la fisiología y capacidades genéticas de este género por lo que se desconoce las capacidades promotoras del crecimiento vegetal.

2.2.20 *Maledivibacter*

Este género está constituido por un único género bacteriano (*M. halophilus* también denominado *Clostridium halophilum*) inicialmente aislada de sedimentos marinos pasteurizados. Esta bacteria requiere para su crecimiento concentraciones de NaCl superiores al 1,5 % (Fendrich et al., 1990). Su metabolismo fermentativo, es capaz de emplear para ello un elevado rango de productos orgánicos, resulta en la producción de acetato y etanol principalmente y, además, es capaz de producir SH_2 por lo que contribuye a disminuir la toxicidad del H_2 en el medio (Li et al., 2016). La presencia de este microorganismo en suelos no se ha descrito hasta la fecha por lo que se desconoce su potencial papel como PGPR.

2.2.21 *Desulfothermobacter*

Este género pertenece al grupo de las bacterias reductoras del sulfato y es capaz de crecer empleando únicamente H_2 como fuente de energía, HCO_3/CO_2 como fuente de carbono y SO_4^{2-} como aceptor de electrones (Frolov et al., 2018). Además, es capaz de crecer heterotróficamente mediante la fermentación de diferentes compuestos reduciéndolos hasta acetato H_2 y CO_2. Por otra parte, es capaz de crecer en ambientes ácidos (hasta pH 2.9) tras una larga fase de adaptación (Frolov et al., 2018). Puesto que esta bacteria ha sido recientemente aislada se desconoce en gran medida su capacidad de estimular el crecimiento vegetal mediante mecanismos distintos a la producción de VOCs.

2.2.22 *Urmitella*

Esta bacteria se aisló inicialmente en muestras de heces humanas (Pham et al., 2017; Traversi et al., 2020) y, además, en purines de cerdos empleados para la producción de estiércol (Im et al., 2020). Esta bacteria se ha descrito como acidogénica, la cual descompone diferentes macromoléculas orgánicas en moléculas orgánicas de pequeño tamaño (Im et al., 2020). Se desconocen en gran medida las capacidades metabólicas de esta bacteria, por lo que, no se han descrito otras actividades promotoras del crecimiento vegetal excepto la producción de VOCs tras el proceso de fermentación.

2.3. Resumen de las actividades promotoras del crecimiento vegetal del consorcio.

Este biofertilizante está compuesto por un consorcio microbiano adaptado de forma óptima al CSM. Debido a su origen (caña de azúcar y remolacha azucarera), el CMS está enriquecido en materia lignocelulósica (principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina) que puede llegar hasta el 35 % del peso total del vegetal (Soares et al., 2020). El consorcio microbiano analizado contiene géneros bacterianos que en conjunto abarcan la totalidad de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal. Es decir, fijación de nitrógeno (*Clostridium* y *Paenibacillus*), solubilizadores del P y K (*Lactobacillus*, *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Caldicoprobacter*), producción de sideróforos (*Clostridium* y *Paenibacillus*), síntesis de hormonas vegetales (*Clostridium* y *Paenibacillus*), actividad ACC-deaminasa (*Lactobacillus*), capacidad de biocontrol (*Lactobacillus*, *Acetomicrobium*, *Clostridium* y *Paenibacillus*) e inducción de la respuesta sistémica (*Lactobacillus* y *Paenibacillus*). Además, la mayoría de estos géneros están relacionados con la metabolización de compuestos orgánicos complejos, lo que favorece la actividad biológica del suelo de forma general. Así, mediante la adición al suelo de estos sustratos fácilmente asimilables por los microorganismos se incrementa la cantidad y disponibilidad de nutrientes mejorándose la capacidad de desarrollo de las plantas. Por otra parte, la asimilación y transformación de la biomasa por parte del consorcio microbiano genera diferentes moléculas que se han propuesto como VOCs, entre los que destaca el acetato, propionato, butirato, lactato o ácido fórmico, etanol (Effmert et al., 2012) o incluso el CO_2 (Kai y Piechulla, 2009), cuya presencia en el suelo resulta en una estimulación del crecimiento vegetal favoreciéndose la germinación de semillas, tiempo y número de floración y la producción de frutos. Así, junto a los mecanismos clásicos de las bacterias PGPR se une la producción de VOCs mediante la actuación sinérgica y secuencial del consorcio que interviene en la degradación de la biomasa vegetal mediante interacciones mutualistas estrechamente acopladas (Morris et al., 2013) o estrategia "Feeding Together". Así, la obtención de los VOCs se inicia por la actuación de bacterias líticas (*Alkaliphilus, Breznakia, Caldicoprobacter, Clostridium*, *Defluviitoga, Paenibacillus y Tepidimicrobium*), seguida de la fermentación hasta azúcares sencillos por parte de los fermentadores primarios (*Acetomicrobium, Gelria, Lactobacillus, Lutaonella, Pelotomaculum, Proteiniphilum, Syntrophaceticus, Tepidanaerobacter*) y, finalmente, su degradación hasta VOCs (acetato, etanol y CO_2) por las bacterias fermentadoras secundarias (*Maledivibacter, Pelotomaculum, Syntrophaceticus, Urmitella*). Además, las bacterias acetogénicas (*Maledivibacter*) y las reductoras del sulfato (*Desulfonispora, Desulfothermobacter*) disminuyen la presión parcial de H_2 que se genera en las distintas fermentaciones favoreciendo el funcionamiento del consorcio. La figura 6 muestra un esquema de los distintos procesos simbióticos que se producen en el consorcio.

Por otra parte hay que tener en cuenta, que algunos de estos géneros, especialmente los que dominan la comunidad (*Lactobacillus*, *Defluviitoga*, *Acholeplasma* y *Pelotomaculum*) son necesarios para la maduración del biofertilzante en sí al realizar distintos procesos líticos y fermentativos en el CMS, ya que aumentan la biodisponibilidad de nutrientes disponibles para

el resto de la comunidad así como del contenido en nutrientes que va a llegar al suelo al aplicarse el producto y que de manera inespecífica mejora la calidad del cultivo. Además, las bacterianas lácticas van a prevenir el crecimiento de hongos mejorando la estabilidad del producto así como su aspecto visual y organoléptico.

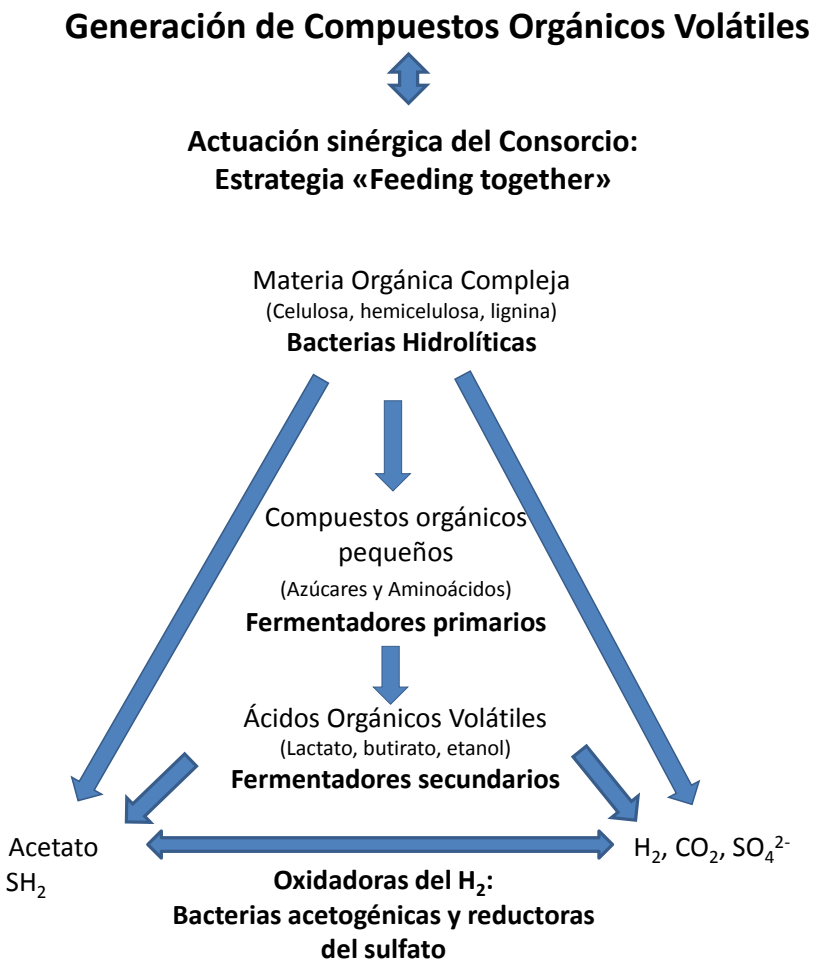

Figura 6. Esquema de la formación de VOCs a partir de la degradación de la materia orgánica compleja en la que está enriquecido el CMS por parte del consorcio bacteriano.

Objetivo parcial 3. Evaluar la mejora del rendimiento de los cultivos tanto a escala agrícola como en mesocosmos.

Para la consecución de este objetivo se realizó un estudio en campo donde se cultivaron plantas de patata (*Solanum tuberosum*) sujetas a diferentes técnicas de fertilización y, además, se evalúo la comunidad microbiana en suelos cultivados con esparrago (*Asparagus officinalis*) y con calabacín (*Cucurbita pepo*).

3.1 Determinación del efecto de diferentes tipos de fertilización (estercolada, mediante aplicación de CMS o aplicación de biofertilizante) en la comunidad bacteriana de suelos cultivados con patata.

Para cumplimentar este objetivo se utilizó un cultivo de patata sembrado en una finca agrícola de una extensión aproximada de 1.5 hectáreas y se dividió en 3 zonas de igual tamaño (4.500 m^2) en donde se aplicaron diferentes enmiendas de carbono a una dosis de producto de 20 tn/ha de acuerdo a las recomendaciones del Ministerio de Medio Ambiente. Puesto que el contenido en COT (Carbono Organico Total) fue similar entre el estiércol y el CMS no se realizó conversión alguna de la dosis a aplicar entre los tres tipos de fertilizantes. Los tratamientos realizados fueron:

- Estiércol (Dosis 20 tn/ha, en total 10 tn de estiércol)
- Condesado soluble de melaza (CMS) (Dosis 20 tn/h en total 9.000 litros de CMS)
- Biofertilizante (Dosis 20 tn/ha, compuesto por 1.000 L de biofertilizante madurado durante un mes (fragmentación 1/3 biol/CMS) más 8.000 l de CMS)

Tras la aplicación de las distintas enmiendas orgánicas, el suelo se dejó reposar durante un mes antes de realizarse la siembra (septiembre de 2019). Posteriormente, 30 días después de la siembra se determinó el tamaño de 15 plantas emergidas en tres áreas diferentes en cada una de las zonas en las que se aplicó el fertilizante (45 plantas por tratamiento). La longitud promedio de las plantas en la parcela donde se aplicó el biofertilizante fue de 12,4 cm, valor estadísticamente superior al tamaño de las plantas de patata en las otra tres pacerlas, seguida de las plantas en las que se aplicó el CMS (11,04 cm) y, por último, las plantas a las que se aplicó una estercolación tradicional (10,38 cm). Por tanto, la aplicación del biofertilizante estimula el desarrollo vegetal en etapas tempranas del desarrollo vegetal.

Por otra parte, se determinó el contenido en carbono orgánico total (COT) del suelo en las tres zonas. El contenido promedio de COT fue del 2,04 %, aunque existieron algunas diferencias entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas (suelo CMS: 2,11 %, suelo biofertilizante: 2,01 %, suelo estercolado: 1,93 %).

Finalmente, a finales del mes de marzo de 2020 se realizó la cosecha de las plantas de patata. En días previos, se tomaron 10 plantas de forma aleatoria de cada una de las tres zonas con tratamientos distintos y se determinó la longitud de la parte aérea, el grosor y el peso de las 30 plantas de patata. Los valores promedio fueron de 65.17 cm, 11.77 cm y 102,17 g para la longitud, grosor y peso, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las plantas de cada uno de los tres tratamientos. Por otra parte, se determinó la calidad visual de las patatas para ello se observaron visualmente 300 patatas por tratamiento. De acuerdo a estos datos, la mejor calidad se observó en la zona donde se aplicó el biofertilizante (solo el 6 % de las patata presentaron marcas por nematodos), seguidas del CMS (afectación del 9 %) y, por último, los tubérculos de la zona donde se aplicó el estiércol (12 % tuvieron una mala calidad).

3.2 Determinación de la abundancia total de bacterias.

Para la determinación de estas abundancias se empleó el gen 16S rRNA en el suelo no asociado a la planta o suelo bruto y en suelo íntimamente asociado a la planta o suelo rizosférico, tanto del unido a la raíz como del unido al tubérculo.

De acuerdo al número de copias del gen 16S rRNA en los suelos (Figura 7), no existieron diferencias entre el tamaño de la comunidad microbiana en el suelo empleado como control (suelo no cultivado) al inicio y final de la cosecha de patata. Por otra parte, el número de copias del gen 16S rRNA en el suelo adicionado de estiércol fue similar a los números de copias observado para el suelo control. Por el contrario, la abundancia de bacterias se incrementó significativamente en los suelos donde se aplicó el CMS o el biofertiliznate, sin existir diferencias en el número de bacterias entre los suelos de estos dos tratamientos. De igual se modo, se cuantificó la población bacteriana total en las muestras de suelo rizosférico de raíz y patata. Estos resultados se muestran en la Figura 8.

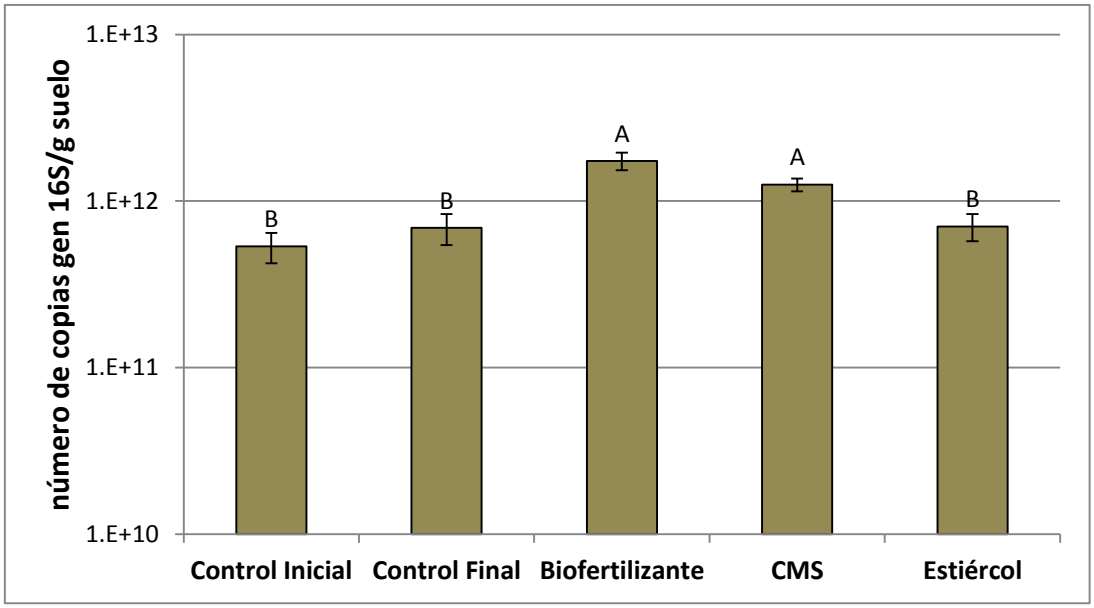

Figura 7. Número de copias del gen 16S rRNA por kg de suelo bruto determinado mediante qPCR. Se muestran valores medios ± SD (n=3) de tres muestras independientes, distintas letras indican diferencias estadísticas entre muestras de acuerdo al test Anova (P < 0,05).

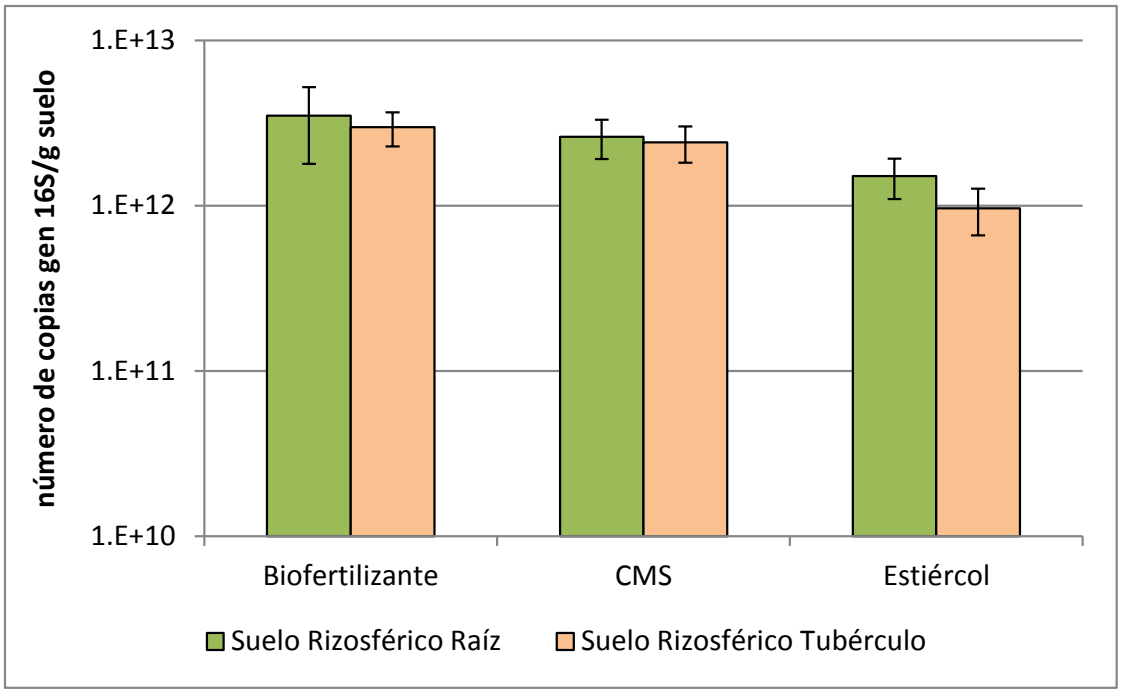

Figura 8. Número de copias del gen 16S rRNA por kg de suelo rizosfericos de raíz y tubérculo determinado mediante qPCR. Se muestran valores medios ± SD (n=3) de tres muestras independientes, distintas letras indican diferencias estadísticas entre muestras de acuerdo al test Anova ($P < 0,05$).

3.3 Determinación del efecto de la aplicación del biofertilizante sobre la comunidad microbiana suelos cultivados con espárrago y calabacín.

3.3.1. Determinación del tamaño y estructura de la comunidad bacteriana en suelos cultivados con espárragos.

Para la realización de esta tarea se tomaron muestras de suelo bruto y suelo rizosférico de suelos cultivados con espárragos en los que se aplicó el biofertilizante para controlar la infección por hongos que afectaban a dichos cultivos. Tras la aplicación de este producto se produjo una mejora del estado de las plantas de acuerdo a la información suministrada por los agricultores. El manejo de estos suelos se realizó de acuerdo a las prácticas agrícolas convencionales de este tipo de cultivos.

El número de copias del gen 16S rRNA se muestra en la Figura 9. De acuerdo a estos datos, la biofertilización produce una estimulación del tamaño de la comunidad. Mientras que este aumento fue estadísticamente significativo para los suelos no rizosféricos (suelo bruto), este aumento no fue significativo para el suelo rizosférico tal como se observó para el experimento en el que se empleó como vegetal cultivos de patata.

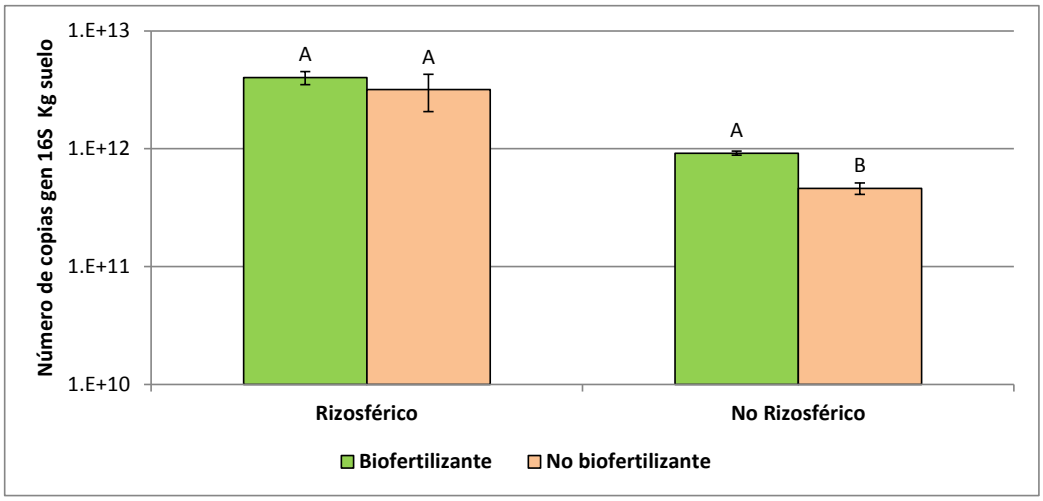

Figura 9. Número de copias del gen 16S rRNA por kg de suelos cultivados con espárragos determinado mediante qPCR. Se muestran valores medios ± SD (n=3) de tres muestras independientes, distintas letras indican diferencias estadísticas entre muestras de acuerdo al test de Fisher (P < 0,05).

3.3.2. Determinación del tamaño y estructura de la comunidad bacteriana en suelos cultivados con calabacín.

Como aproximación para evaluar el papel PGPR del biofertilizante en suelos con menor contenido en nutrientes se evaluó un suelo arenoso de la provincia de Almería en cultivo intensivo. La aplicación del producto biofertilizante de acuerdo a las prácticas agrícolas recomendadas en la ficha técnica del producto.

La cuantificación de la población bacteriana indica un efecto significativo en la población total bacteriana que integra estos suelos arenosos cuando se aplica el biofertilizante.

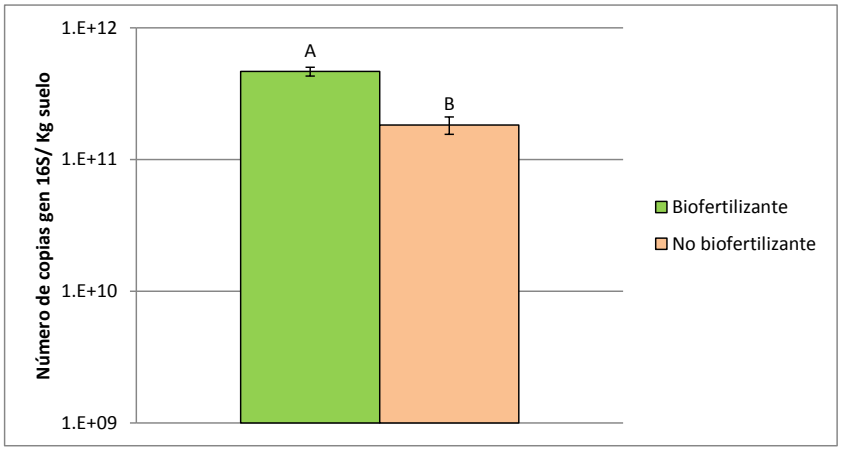

Figura 10. Número de copias del gen 16S rRNA por kg de suelos cultivados con calabacín determinado mediante qPCR. Se muestran valores medios ± SD (n=3) de tres muestras independientes, distintas letras indican diferencias estadísticas entre muestras de acuerdo al test de Fisher (P < 0,05).

3.4. Importancia de la investigación del consorcio sobre la actividad promotora vegetal de las bacterias del suelo.

Debido al aumento de la población a nivel mundial y a la creciente demanda de alimentos, es imperativo aumentar la fertilidad del suelo con el propósito de aumentar la producción de cultivos, en consecuencia, satisfacer la demanda de alimentos a escala global de una manera respetuosa con el medio ambiente (Pandey et al., 2012). En la actualidad, se emplean para ello diferentes estrategias tales como la adecuación de la fertilización al estado real del suelo, el uso de co-cultivos, rotaciones diversificadas de los cultivos o una labranza que reduzca la perturbación del suelo, uno de estos enfoques implica el uso de PGPRs en beneficio del crecimiento de las plantas. De hecho, el uso de estas bacterias se considera un excelente enfoque ecológico y biotecnológico para reemplazar los productos químicos más nocivos para la salud del suelo (Panwar et al., 2014).

En general, los estudios en campo han permitido determinar el efecto potencial que este biofertilizante tiene como agente estimulador de la comunidad bacteriana nativa del suelo. Este efecto modulador resulta en la mejora del crecimiento vegetal ya sea directa o indirectamente a través de los mecanismos anteriormente descritos, esto es, capacidad de fijar N, solubilización de nutrientes (P y K), promoción de la asimilación del Fe, producción fitohormonas estimulantes del crecimiento de las plantas e inhibición de hormonas perjudiciales para el desarrollo vegetal (disminución del nivel de etileno), control biológico de los patógenos e inducción de la resistencia sistémica. Igualmente se ha demostrado que una aumento en el número de bacterias del suelo incrementa la producción y rendimiento de las cosechas (Bashan et al., 2014, Olanrewaju et al., 2017). De hecho, diferentes estudios han demostrado que la inoculación de consorcios bacterianos es un resultado efectivo para mejorar el crecimiento vegetal (Pandey et al., 2012; Cheng et al., 2020).

Por tanto, el consorcio bacteriano empleado en este proyecto de investigación se presenta como un prometedor biofertilizante que es capaz de incrementar la comunidad bacteriana de los suelos biofertilizante. Y por tanto, este biofertilizante se perfila como una herramienta útil en la agricultura sostenible con capacidad de mejorar la salud del suelo desde un enfoque holístico.

Objetivo parcial 4. Escalamiento del CMS inoculado con el biol para la producción de un bioestimulante de las comunidades microbianas promotoras del crecimiento vegetal.

De acuerdo a los resultados obtenidos respecto a la capacidad de supervivencia de la comunidad microbiana del biol en el CMS, la estabilidad la estructura de dicha comunidad y el efecto estimulante sobre la microbiota del suelo el producto inicial se perfila como un prometedor bioestimulante de las comunidades microbianas del suelo. Con la finalidad de producir este producto a escala industrial se inoculó un bioreactor con el consorcio bacteriano madurado adicionando CMS diferentes cantidades de CMS hasta conseguir un replicación efectiva por parte de la comunidad microbiana. De esto modo, se adicionó paulatinamente CMS al inóculo durante 6 meses para conseguir la completa adaptación de la comunidad al medio de cultivo.

Por otra parte, se ha realizado un seguimiento de la abundancia total de bacterias durante 18 meses (septiembre 2020-marzo 2022) mediante qPCR a tiempo real del gen 16S rRNA para asegurar la viabilidad del consorcio microbiano en el CMS. De acuerdo a los datos mostrados

en la Figura 11, desde la inoculación del biorreactor se ha incrementado estadísticamente la población bacteriana total de la comunidad bacteriana. Así, el número de copias del gen 16S rRNA se ha incrementado en dos órdenes de magnitud a lo largo del proceso y, actualmente, la abundancia total del gen 16S rRNA es de $1{,}06 \times 10^{10}$ copias/L.

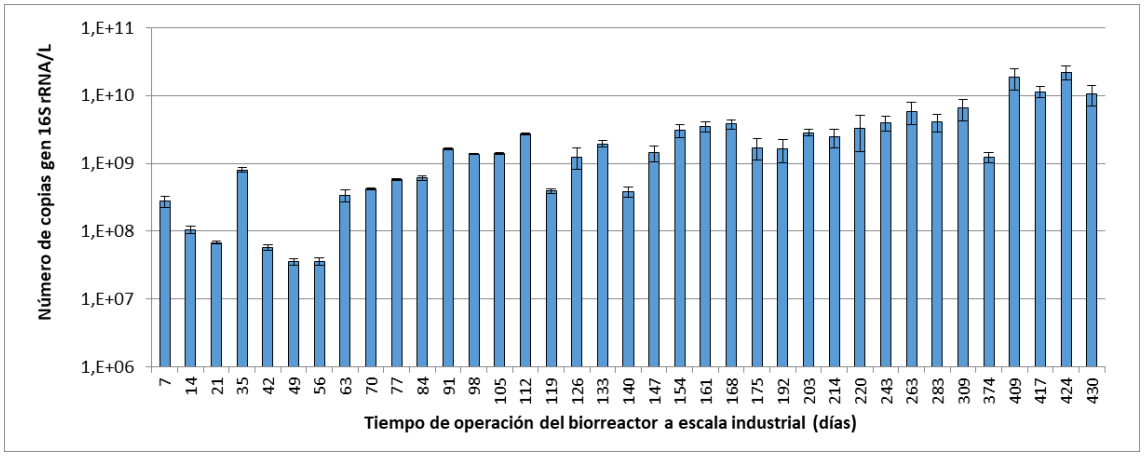

Figura 11. Número de copias del gen 16S rRNA por L de CMS determinado mediante qPCR. Se muestran valores medios ± SD (n=3) de tres extracciones de DNA por cada tiempo de muestreo

Por tanto, la estrategia empleada en esta investigación ha resultado en la obtención de una comunidad microbiana con diferentes miembros con múltiples capacidades PGPR mediante diferentes mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal tales como fijación de N, la solubilización de P, K y Zn, producción de sideróforos, síntesis de fitohormonas (auxinas, ácido indol acético, citoquininas, giberilinas y ácido abscísico) y reducción del contenido en etileno por la acción de la enzima ACC-desaminasa, control biológico de patógenos e inducción de la resistencia sistémica de las plantas.

Por tanto podemos concluir que la inoculación del CMS con el consorcio previamente desarrollado producto generado en el obtjetivo 1 y su posterior maduración con concentraciones crecientes de CMS en el biorreactor se ha conseguido producir el bioestimulante a escala industrial no sólo manteniendo la abundancia total del número de bacterias si no aumentando significativamente el número de microorganismos presentes en el producto.

Firmado:

UNIVERSIDAD DE GRANADA

AZUCARERA DEL GUADALFEO
División C.M.S.

David Correa Galeote

Miembro del equipo investigador

CORREA GALEOTE DAVID - 74729983Q

Firmado digitalmente por CORREA GALEOTE DAVID - 74729983Q
Fecha: 2022.03.28 18:48:11 +02'00'

Jesús González López

Investigador principal

GONZALEZ LOPEZ JESUS JUAN - 30411031V

Digitally signed by GONZALEZ LOPEZ JESUS JUAN - 30411031V
Date: 2022.03.26 18:21:18 +01'00'

Referencias:

Ahmad, M., Nadeem, S. M., Naveed, M., & Zahir, Z. A. (2016). Potassium-solubilizing bacteria and their application in agriculture. In Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture (pp. 293-313). Springer, New Delhi.

Aino, K., Hirota, K., Okamoto, T., Tu, Z., Matsuyama, H., & Yumoto, I. (2018). Microbial communities associated with indigo fermentation that thrive in anaerobic alkaline environments. Frontiers in microbiology, 9, 2196.

Arun, A. B., Chen, W. M., Lai, W. A., Chou, J. H., Shen, F. T., Rekha, P. D., & Young, C. C. (2009). Lutaonella thermophila gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic member of the family Flavobacteriaceae isolated from a coastal hot spring. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 59(8), 2069-2073.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant and soil, 378(1-2), 1-33.

Behera, P., Mohapatra, M., Adhya, T. K., Suar, M., Pattnaik, A. K., & Rastogi, G. (2018). Structural and metabolic diversity of rhizosphere microbial communities of Phragmites karka in a tropical coastal lagoon. Applied Soil Ecology, 125, 202-212.

Beraud-Martínez, L. K., Gómez-Gil, B., Franco-Nava, M. Á., Almazán-Rueda, P., & Betancourt-Lozano, M. (2020). A metagenomic assessment of microbial communities in anaerobic bioreactors and sediments: taxonomic and functional relationships. Anaerobe, 102296.

Bhargava, P., Singh, A. K., & Goel, R. (2017). Microbes: bioresource in agriculture and environmental sustainability. In Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives (pp. 361-376). Springer, Singapore.

Blain, N. P., Helgason, B. L., & Germida, J. J. (2017). Endophytic root bacteria associated with the natural vegetation growing at the hydrocarbon-contaminated Bitumount Provincial Historic site. Canadian journal of microbiology, 63(6), 502-515.

Bohra, V., Tikariha, H., & Dafale, N. A. (2019). Genomically defined Paenibacillus polymyxa ND24 for efficient cellulase production utilizing sugarcane bagasse as a substrate. Applied biochemistry and biotechnology, 187(1), 266-281.

Borozan, A. B., Bordea, D. M., Dogaru, D., Popescu, S., & Horablaga, M. (2016). Findings of rhizosphere colonization capacities by nitrogen fixing bacteria from Azotobacter and Clostridium. International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM, 2, 127-132.

Bouanane-Darenfed, A., Hania, W. B., Hacene, H., Cayol, J. L., Ollivier, B., & Fardeau, M. L. (2013). Caldicoprobacter guelmensis sp. nov., a thermophilic, anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from a hot spring. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63(6), 2049-2053.

Campagnollo, F. B., Ganev, K. C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A. G., Granato, D., et al. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. Food Control, 68, 310-329.

Chaluvadi, S., & Bennetzen, J. L. (2018). Species-associated differences in the below-ground microbiomes of wild and domesticated Setaria. Frontiers in plant science, 9, 1183.

Chen, S., & Dong, X. (2005). Proteiniphilum acetatigenes gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(6), 2257-2261.

Cheng, Y., Luo, J., Wang, Y., Ge, J., Zhou, S., Yang, W., & Kou, J. (2020). Staphylococcus hominis YJILJH and Staphylococcus epidermidis YJ101 promote the growth of white clover (Trifolium repens L.) by increasing available phosphorus. Symbiosis, 1-12.

Conners, S. B., Mongodin, E. F., Johnson, M. R., Montero, C. I., Nelson, K. E., & Kelly, R. M. (2006). Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic Thermotoga species. FEMS microbiology reviews, 30(6), 872-905.

Cook, L. E., Gang, S. S., Ihlan, A., Maune, M., Tanner, R. S., McInerney, M. J., et al. (2018). Genome sequence of Acetomicrobium hydrogeniformans OS1. Genome announcements, 6(26).

Correa-Galeote, D., Tortosa, G., & Bedmar, E. J. (2013). Determination of denitrification genes abundance in environmental samples. Metagenomics, 2(235702), 10-4303.

Das, S., Chou, M. L., Jean, J. S., Yang, H. J., & Kim, P. J. (2017). Arsenic-enrichment enhanced root exudates and altered rhizosphere microbial communities and activities in hyperaccumulator Pteris vittata. Journal of hazardous materials, 325, 279-287.

de Jonge, N., Davidsson, Å., la Cour Jansen, J., & Nielsen, J. L. (2020). Characterisation of microbial communities for improved management of anaerobic digestion of food waste. Waste Management, 117, 124-135.

Dixit, R., Agrawal, L., Gupta, S., Kumar, M., Yadav, S., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). Southern blight disease of tomato control by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing Paenibacillus lentimorbus B-30488. *Plant signaling & behavior*, *11*(2), e1113363.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. Antonie Van Leeuwenhoek, 106(1), 85-125.

Dutta, S., & Podile, A. R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. Critical reviews in microbiology, 36(3), 232-244.

Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of chemical ecology*, *38*(6), 665-703.

Ehsanipour, M., Suko, A. V., & Bura, R. (2016). Fermentation of lignocellulosic sugars to acetic acid by Moorella thermoacetica. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 43(6), 807-816.

Etemadi, N., Müller, M., Etemadi, M., Brandón, M. G., Ascher-Jenull, J., & Insam, H. (2020). Salt tolerance of Cressa cretica and its rhizosphere microbiota. Biologia, 75(3), 355-366.

Fendrich, C., Hippe, H., & Gottschalk, G. (1990). Clostridium halophilium sp. nov. and C. litorale sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction. Archives of microbiology, 154(2), 127-132.

Flüchter, S., Poehlein, A., Schiel-Bengelsdorf, B., Daniel, R., & Dürre, P. (2016). Genome sequence of the poly-3-hydroxybutyrate producer Clostridium acetireducens DSM 10703. Genome announcements, 4(6).

Frolov, E. N., Zayulina, K. S., Kopitsyn, D. S., Kublanov, I. V., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Chernyh, N. A. (2018). Desulfothermobacter acidiphilus gen. nov., sp. nov., a thermoacidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68(3), 871-875.

Fu, H. L., Meng, Y., Ordóñez, E., Villadangos, A. F., Bhattacharjee, H., Gil, J. A., et al. (2009). Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from Alkaliphilus metalliredigens and Corynebacterium glutamicum. Journal of Biological Chemistry, 284(30), 19887-19895.

Gerbaldo, G. A., Barberis, C., Pascual, L., Dalcero, A., & Barberis, L. (2012). Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties. FEMS microbiology letters, 332(1), 27-33.

Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2019). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial appli

Gößner, A. S., Devereux, R., Ohnemüller, N., Acker, G., Stackebrandt, E., & Drake, H. L. (1999). Thermicanus aegyptius gen. nov., sp. nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen Moorella thermoacetica. Applied and environmental microbiology, 65(11), 5124-5133.

Guang, Z., Li, W., Fang, M., Zhe, W., Xin-wei, G., & Ting, Z. (2011, May). Pyrosequence-based 16S rRNA investigation of bacterial community in dry fermentation of rice stalk. In 2011 International Conference on Materials for Renewable Energy & Environment (Vol. 1, pp. 386-389). IEEE.

Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. J Microb Biochem Technol, 7(2), 096-102.

Haldar, S., Choudhury, S. R., & Sengupta, S. (2011). Genetic and functional diversities of bacterial communities in the rhizosphere of Arachis hypogaea. Antonie Van Leeuwenhoek, 100(1), 161-170.

Halim, M. A., Rahman, M. M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2020). Cadmium Immobilization in the Rhizosphere and Plant Cellular Detoxification: Role of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria as a Sustainable Solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Hania, W. B., Bouanane-Darenfed, A., Cayol, J. L., Ollivier, B., & Fardeau, M. L. (2016). Reclassification of Anaerobaculum mobile, Anaerobaculum thermoterrenum, Anaerobaculum hydrogeniformans as Acetomicrobium mobile comb. nov., Acetomicrobium thermoterrenum comb. nov. and Acetomicrobium hydrogeniformans comb. nov., respectively, and emendation of the genus Acetomicrobium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(3), 1506-1509.

Haugland, R. A., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L., & Shanks, O. C. (2010). Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected Bacteroidales species and human fecal waste by qPCR. *Systematic and Applied Microbiology*, *33*(6), 348-357.

He, M., Zhang, J., Shen, L., Xu, L., Luo, W., Li, D., et al. (2019). High-throughput sequencing analysis of microbial community diversity in response to indica and japonica bar-transgenic rice paddy soils. PloS one, 14(9), e0222191.

Heenan-Daly, D., Velivelli, S. L., & Prestwich, B. D. (2019). The Role of Rhizobacterial Volatile Organic Compounds in a Second Green Revolution—The Story so Far. In Field Crops: Sustainable Management by PGPR (pp. 191-220). Springer, Cham.

Hernández, M., Dumont, M. G., Yuan, Q., & Conrad, R. (2015). Different bacterial populations associated with the roots and rhizosphere of rice incorporate plant-derived carbon. Applied and environmental microbiology, 81(6), 2244-2253.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 11(8), 506.

Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Dean, D. R., & Seefeldt, L. C. (2013). Nitrogenase: a draft mechanism. Accounts of chemical research, 46(2), 587-595.

Hu, Q., Gao, X., & Wang, Y. (2020). Metabolomics analysis of carotenoid production from Proteiniphilum acetatigenes PSB-W based on LC-MS. *African Journal of Microbiology Research*, *14*(8), 410-419.

Hussein, K. A., & Joo, J. H. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria improved salinity tolerance of Lactuca sativa and Raphanus sativus. Journal of microbiology and biotechnology, 28(6), 938-945.

Hwang, C., Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, J. C., et al. (2016). Complete genome sequence of Alkaliphilus metalliredigens strain QYMF, an alkaliphilic and metal-reducing bacterium isolated from borax-contaminated leachate ponds. Genome announcements, 4(6).

Im, S., Mostafa, A., Shin, S. R., & Kim, D. H. (2020). Combination of H2SO4-acidification and temperature-decrease for eco-friendly storage of pig slurry. Journal of Hazardous Materials, 123063.

Jia, J., Ji, B., Tian, L., Li, M., Lu, M., Ding, L., et al. (2020). Mechanism study on enhanced foaming properties of individual albumen proteins by Lactobacillus fermentation. *Food Hydrocolloids*, *111*, 106218.

Juteau, P., Côté, V., Duckett, M. F., Beaudet, R., Lépine, F., Villemur, R., & Bisaillon, J. G. (2005). Cryptanaerobacter phenolicus gen. nov., sp. nov., an anaerobe that transforms phenol into benzoate via 4-hydroxybenzoate. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 55(1), 245-250.

Kai, M., & Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles–An effect of CO2?. FEBS letters, 583(21), 3473-3477.

Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. Frontiers in plant science, 6, 151.

Kang, S. M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Khan, A. L., Park, J. M., Lee, S. M., & Lee, I. J. (2015). Cucumber performance is improved by inoculation with plant growth-promoting microorganisms. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science, 65(1), 36-44.

Kanno, M., Katayama, T., Morita, N., Tamaki, H., Hanada, S., & Kamagata, Y. (2015). Catenisphaera adipataccumulans gen. nov., sp. nov., a member of the family Erysipelotrichaceae isolated from an anaerobic digester. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 65(3), 805-810.

Kavamura, V. N., Hayat, R., Clark, I. M., Rossmann, M., Mendes, R., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2018). Inorganic nitrogen application affects both taxonomical and predicted functional structure of wheat rhizosphere bacterial communities. Frontiers in microbiology, 9, 1074.

Kim, E., Lee, J., Han, G., & Hwang, S. (2018). Comprehensive analysis of microbial communities in full-scale mesophilic and thermophilic anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater. Bioresource technology, 259, 442-450.

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature, 286(5776), 885.

Kõiv, V., Roosaare, M., Vedler, E., Kivistik, P. A., Toppi, K., Schryer, D. W., et al. (2015). Microbial population dynamics in response to Pectobacterium atrosepticum infection in potato tubers. Scientific reports, 5, 11606.

Kosaka, T., Kato, S., Shimoyama, T., Ishii, S., Abe, T., & Watanabe, K. (2008). The genome of Pelotomaculum thermopropionicum reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota. Genome research, 18(3), 442-448.

Kumagai, P. S., Gutierrez, R. F., Lopes, J. L., Martins, J. M., Jameson, D. M., Castro, A. M., et al. (2018). Characterization of esterase activity from an Acetomicrobium hydrogeniformans enzyme with high structural stability in extreme conditions. Extremophiles, 22(5), 781-793.

Lagos, L. M., Navarrete, O. U., Maruyama, F., Crowley, D. E., Cid, F. P., Mora, M. L., & Jorquera, M. A. (2014). Bacterial community structures in rhizosphere microsites of ryegrass (Lolium perenne var. Nui) as revealed by pyrosequencing. Biology and fertility of soils, 50(8), 1253-1266.

Lee, C. G., Iida, T., Uwagaki, Y., Otani, Y., Nakaho, K., & Ohkuma, M. (2017). Comparison of prokaryotic and eukaryotic communities in soil samples with and without tomato bacterial wilt collected from different fields. Microbes and environments, ME17131.

Lee, S. M., Kong, H. G., Song, G. C., & Ryu, C. M. (2020). Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease. The ISME Journal, 1-18.

Li, C., Li, H., Yao, T., Su, M., Ran, F., Han, B., et al. (2019). Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig manure composting with corn straw. Bioresource technology, 289, 121653.

Li, G., Zeng, X., Liu, X., Zhang, X., & Shao, Z. (2016). Wukongibacter baidiensis gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from hydrothermal sulfides, and proposal for the reclassification of the closely related Clostridium halophilum and Clostridium caminithermale within Maledivibacter gen. nov. and Paramaledivibacter gen. nov., respectively. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66(11), 4355-4361.

Li, L., Qu, Z., Wang, B., Jia, R., & Qu, D. (2019). The response of metabolically active Clostridium community to initial pH shift is closely correlated with microbial Fe (III) reduction in flooded paddy soils. Journal of Soils and Sediments, 19(2), 522-532.

Li, X. G., Ding, C. F., Hua, K., Zhang, T. L., Zhang, Y. N., Zhao, L., et al. (2014). Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy. Soil Biology and Biochemistry, 78, 149-159.

Lianhua, L., Ying, L., Yongming, S., Zhenhong, Y., Xihui, K., Yi, Z., & Gaixiu, Y. (2018). Effect of bioaugmentation on the microbial community and mono-digestion performance of Pennisetum hybrid. Waste Management, 78, 741-749.

Liu, M. K., Tang, Y. M., Guo, X. J., Zhao, K., Tian, X. H., Liu, Y., et al. (2017). Deep sequencing reveals high bacterial diversity and phylogenetic novelty in pit mud from Luzhou Laojiao cellars for Chinese strong-flavor Baijiu. *Food research international*, *102*, 68-76.

Liu, P., & Conrad, R. (2017). Syntrophobacteraceae-affiliated species are major propionate-degrading sulfate reducers in paddy soil. Environmental microbiology, 19(4), 1669-1686.

Lorentz, R. H., Artico, S., Da Silveira, A. B., Einsfeld, A., & Corção, G. (2006). Evaluation of antimicrobial activity in Paenibacillus spp. strains isolated from natural environment. Letters in applied microbiology, 43(5), 541-547.

Ma, S., Xiong, J., Cui, R., Sun, X., Han, L., Xu, Y., et al. (2020). Effects of intermittent aeration on greenhouse gas emissions and bacterial community succession during large-scale membrane-covered aerobic composting. Journal of Cleaner Production, 121551.

Martínez, H. F. C., Rosero, N. C., Álvarez, A. E. B., Morante-Carriel, J., Malagón, G. C., & Jaramillo, M. P. (2015). Aplicación de Rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género Pseudomonas spp como controladores biológicos de insectos y nemátodos-plagas. Revista Ciencia y Tecnología, 8(1), 25-30.

Maus, I., Koeck, D. E., Cibis, K. G., Hahnke, S., Kim, Y. S., Langer, T., et al. (2016). Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. Biotechnology for biofuels, 9(1), 171.

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2010). Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Centro de Publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Mitter, E. K., de Freitas, J. R., & Germida, J. J. (2017). Bacterial root microbiome of plants growing in oil sands reclamation covers. Frontiers in microbiology, 8, 849.

Morris, B. E., Henneberger, R., Huber, H., & Moissl-Eichinger, C. (2013). Microbial syntrophy: interaction for the common good. FEMS microbiology reviews, 37(3), 384-406.

Mowlick, S., Yasukawa, H., Inoue, T., Takehara, T., Kaku, N., Ueki, K., & Ueki, A. (2013). Suppression of spinach wilt disease by biological soil disinfestation incorporated with Brassica juncea plants in association with changes in soil bacterial communities. Crop Protection, 54, 185-193.

Narihiro, T., & Kamagata, Y. (2017). Genomics and metagenomics in microbial ecology: recent advances and challenges. Microbes and environments, 32(1), 1-4.

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(11), 197.

Ozuolmez, D., Stams, A. J., & Plugge, C. M. (2020). Propionate converting anaerobic microbial communities enriched from distinct biogeochemical zones of Aarhus Bay, Denmark under sulfidogenic and methanogenic conditions. Microorganisms, 8(3), 394.

Pahalagedara, A. S. N. W., Flint, S., Palmer, J., Brightwell, G., & Gupta, T. B. (2020). Antimicrobial production by strictly anaerobic Clostridium spp. International Journal of Antimicrobial Agents, 55(5), 105910.

Pandey, P., Bisht, S., Sood, A., Aeron, A., Sharma, G. D., & Maheshwari, D. K. (2012). Consortium of plant-growth-promoting bacteria: Future perspective in agriculture. In Bacteria in Agrobiology: Plant Probiotics (pp. 185-200). Springer, Berlin, Heidelberg.

Panwar, M., Tewari, R., & Nayyar, H. (2014). Microbial consortium of plant growth-promoting rhizobacteria improves the performance of plants growing in stressed soils: an overview. In Phosphate Solubilizing Microorganisms (pp. 257-285). Springer, Cham.

Pham, T. P. T., Cadoret, F., Alou, M. T., Brah, S., Diallo, B. A., Diallo, A., et al. (2017). 'Urmitella timonensis' gen. nov., sp. nov.,'Blautia marasmi'sp. nov.,'Lachnoclostridium pacaense'sp. nov.,'Bacillus marasmi'sp. nov. and 'Anaerotruncus rubiinfantis' sp. nov., isolated from stool samples of undernourished African children. New microbes and new infections, 17, 84-88.

Phi, Q. T., Park, Y. M., Seul, K. J., Ryu, C. M., Park, S. H., Kim, J. G., & Ghim, S. Y. (2010). Assessment of root-associated Paenibacillus polymyxa groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. J Microbiol Biotechnol, 20(12), 1605-1613.

Phitsuwan, P., & Ratanakhanokchai, K. (2015). The recovery and bioproperties of a xylanolytic multi-enzyme complex from Tepidimicrobium xylanilyticum BT14. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 120, 28-37.

Pierce, E., Xie, G., Barabote, R. D., Saunders, E., Han, C. S., Detter, J. C., et al. (2008). The complete genome sequence of Moorella thermoacetica (f. Clostridium thermoaceticum). Environmental microbiology, 10(10), 2550-2573.

Plugge, C. M. (2015). Gelria. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1-2.

Plugge, C. M., Balk, M., Zoetendal, E. G., & Stams, A. J. (2002). Gelria glutamica gen. nov., sp. nov., a thermophilic, obligately syntrophic, glutamate-degrading anaerobe. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 52(2), 401-407.

Poly, F., Monrozier, L. J., & 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.

Pramanik, N., Mukherjee, K., Nandy, A., Mukherjee, S., & Kundu, P. P. (2014). Comparative analysis of different properties of polyhydroxyalkanoates isolated from two different bacterial strains: Alkaliphilus oremlandii OhILAs and recombinant Escherichia coli XL1B. Journal of Applied Polymer Science, 131(22).

Quattrini, M., Bernardi, C., Stuknytė, M., Masotti, F., Passera, A., Ricci, G., et al. (2018). Functional characterization of Lactobacillus plantarum ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. Food Research International, 106, 936-944.

Ramos, L. R., Vollú, R. E., Jurelevicius, D., Rosado, A. S., & Seldin, L. (2019). Firmicutes in different soils of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. Polar Biology, 42(12), 2219-2226.

Rani, M. U., Arundhathi, A., & Reddy, G. (2012). Screening of rhizobacteria containing plant growth promoting (PGPR) traits in rhizosphere soils and their role in enhancing growth of pigeon pea. African Journal of Biotechnology, 11(32), 8085-8091.

Roh, Y., Chon, C. M., & Moon, J. W. (2007). Metal reduction and biomineralization by an alkaliphilic metal-reducing bacterium, Alkaliphilus metalliredigens (QYMF). Geosciences Journal, 11(4), 415-423.

Sahu, N., Vasu, D., Sahu, A., Lal, N., & Singh, S. K. (2017). Strength of Microbes in Nutrient Cycling: A Key to Soil Health. In Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture (pp. 69-86). Springer, Singapore

Seifritz, C., Fröstl, J. M., Drake, H. L., & Daniel, S. L. (1999). Glycolate as a metabolic substrate for the acetogen Moorella thermoacetica. FEMS microbiology letters, 170(2), 399-405.

Sekiguchi, Y., Imachi, H., Susilorukmi, A., Muramatsu, M., Ohashi, A., Harada, H., et al. (2006). Tepidanaerobacter syntrophicus gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol-and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 56(7), 1621-1629.

Shikata, A., Sermsathanaswadi, J., Thianheng, P., Baramee, S., Tachaapaikoon, C., Waeonukul, R., et al. (2018). Characterization of an anaerobic, thermophilic, alkaliphilic, high lignocellulosic biomass-degrading bacterial community, ISHI-3, isolated from biocompost. Enzyme and microbial technology, 118, 66-75.

Shikata, A., Sermsathanaswadi, J., Thianheng, P., Baramee, S., Tachaapaikoon, C., Waeonukul, R., et al. (2018). Characterization of an anaerobic, thermophilic, alkaliphilic, high lignocellulosic biomass-degrading bacterial community, ISHI-3, isolated from biocompost. Enzyme and microbial technology, 118, 66-75.

Singh, A. K., Ghodke, I., & Chhatpar, H. S. (2009). Pesticide tolerance of Paenibacillus sp. D1 and its chitinase. Journal of environmental management, 91(2), 358-362.

Slobodkin, A. I., Tourova, T. P., Kostrikina, N. A., Lysenko, A. M., German, K. E., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Birkeland, N. K. (2006). Tepidimicrobium ferriphilum gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe (III)-reducing bacterium of the order Clostridiales. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 56(2), 369-372.

Soares, L. A., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A. (2020). Dissecting the role of heterogeneity and hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse in metabolic pathways for biofuels production. Industrial Crops and Products, 113120.

Soares, L. A., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A. (2020). Dissecting the role of heterogeneity and hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse in metabolic pathways for biofuels production. Industrial Crops and Products, 113120.

Song, C., Li, M., Jia, X., Wei, Z., Zhao, Y., Xi, B., et al. (2014). Comparison of bacterial community structure and dynamics during the thermophilic composting of different types of solid wastes: anaerobic digestion residue, pig manure and chicken manure. Microbial biotechnology, 7(5), 424-433.

Sugai, Y., Owaki, Y., Sasaki, K., Kaneko, F., & Sakai, T. (2014, May). Numerical prediction of reservoir souring based on the growth kinetics of sulfate-reducing bacteria indigenous to an oilfield. In SPE International Oilfield Corrosion Conference and Exhibition. Society of Petroleum Engineers.

Sui, Q., Meng, X., Wang, R., Zhang, J., Yu, D., Chen, M., et al. (2018). Effects of endogenous inhibitors on the evolution of antibiotic resistance genes during high solid anaerobic digestion of swine manure. Bioresource technology, 270, 328-336.

Tachaapaikoon, C., Kosugi, A., Pason, P., Waeonukul, R., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., et al. (2012). Isolation and characterization of a new cellulosome-producing Clostridium thermocellum strain. Biodegradation, 23(1), 57-68.

Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., & Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. PloS one, 9(8), e105592.

Takai, K., Moser, D. P., Onstott, T. C., Spoelstra, N., Pfiffner, S. M., Dohnalkova, A., & Fredrickson, J. K. (2001). Alkaliphilus transvaalensis gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(4), 1245-1256.

Tang, X., Li, L., Wu, C., Khan, M. I., Manzoor, M., Zou, L., & Shi, J. (2020). The response of arsenic bioavailability and microbial community in paddy soil with the application of sulfur fertilizers. Environmental Pollution, 114679.

Tegtmeier, D., Riese, C., Geissinger, O., Radek, R., & Brune, A. (2016). Breznakia blatticola gen. nov. sp. nov. and Breznakia pachnodae sp. nov., two fermenting bacteria isolated from insect guts, and emended description of the family Erysipelotrichaceae. Systematic and applied microbiology, 39(5), 319-329.

Therien, J. B., Artz, J. H., Poudel, S., Hamilton, T. L., Liu, Z., Noone, S. M., et al. (2017). The physiological functions and structural determinants of catalytic bias in the [FeFe]-hydrogenases CpI and CpII of Clostridium pasteurianum strain W5. Frontiers in microbiology, 8, 1305.

Tomazetto, G., Hahnke, S., Wibberg, D., Pühler, A., Klocke, M., & Schlüter, A. (2018). Proteiniphilum saccharofermentans str. M3/6T isolated from a laboratory biogas reactor is versatile in polysaccharide and oligopeptide utilization as deduced from genome-based metabolic reconstructions. *Biotechnology Reports*, *18*, e00254.

Tong, S., Wang, L. W., Sun, Y. C., Khan, M. S., Gao, J. L., & Sun, J. G. (2020). Paenibacillus apii sp. nov., a novel nifH gene-harbouring species isolated from the rhizospheres of vegetable plants

grown in different regions of northern China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(10), 5531-5538.

Traversi, D., Rabbone, I., Scaioli, G., Vallini, C., Carletto, G., Racca, I., et al. (2020). Risk factors for type 1 diabetes, including environmental, behavioural and gut microbial factors: a case–control study. Scientific Reports, 10(1), 1-13.

Wang, Q., Ma, M., Jiang, X., Guan, D., Wei, D., Zhao, B., et al. (2019). Impact of 36 years of nitrogen fertilization on microbial community composition and soil carbon cycling-related enzyme activities in rhizospheres and bulk soils in northeast China. Applied Soil Ecology, 136, 148-157.

Wen, Y., Wu, X., Teng, Y., Qian, C., Zhan, Z., Zhao, Y., & Li, O. (2011). Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by Paenibacillus elgii B69. Environmental microbiology, 13(10), 2726-2737.

Westerholm, M., Roos, S., & Schnürer, A. (2011). Tepidanaerobacter acetatoxydans sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. Systematic and Applied Microbiology, 34(4), 260-266.

Widyasti, E., Shikata, A., Hashim, R., Sulaiman, O., Sudesh, K., Wahjono, E., & Kosugi, A. (2018). Biodegradation of fibrillated oil palm trunk fiber by a novel thermophilic, anaerobic, xylanolytic bacterium Caldicoprobacter sp. CL-2 isolated from compost. Enzyme and microbial technology, 111, 21-28.

Windsor, H. M., Windsor, G. D., & Noordergraaf, J. H. (2010). The growth and long term survival of Acholeplasma laidlawii in media products used in biopharmaceutical manufacturing. Biologicals, 38(2), 204-210.

Wolińska, A., Kuźniar, A., Zielenkiewicz, U., Izak, D., Szafranek-Nakonieczna, A., Banach, A., & Błaszczyk, M. (2017). Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. Applied Soil Ecology, 119, 128-137.

Wolters, B., Jacquiod, S., Sørensen, S. J., Widyasari-Mehta, A., Bech, T. B., Kreuzig, R., & Smalla, K. (2018). Bulk soil and maize rhizosphere resistance genes, mobile genetic elements and microbial communities are differently impacted by organic and inorganic fertilization. FEMS microbiology ecology, 94(4), fiy027.

Xie, J., Shi, H., Du, Z., Wang, T., Liu, X., & Chen, S. (2016). Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in Paenibacillus polymyxa and its closely related species. Scientific reports, 6(1), 1-12.

Xin, K., Li, M., Chen, C., Yang, X., Li, Q., Cheng, J., et al. (2017). Paenibacillus qinlingensis sp. nov., an indole-3-acetic acid-producing bacterium isolated from roots of Sinopodophyllum hexandrum (Royle) Ying. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 67(3), 589-59

Yagi, H., Ninomiya, F., Funabashi, M., & Kunioka, M. (2011). RNA analysis of anaerobic sludge during anaerobic biodegradation of cellulose and poly (lactic acid) by RT-PCR–DGGE. Polymer degradation and stability, 96(4), 547-552.

You, X., Kimura, N., Okura, T., Murakami, S., Okano, R., Shimogami, Y., et al. (2019). Suppressive effects of vermicomposted-bamboo powder on cucumber damping-off. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ, 53(1), 13-19.

Yuan, J., Zhao, M., Li, R., Huang, Q., Raza, W., Rensing, C., & Shen, Q. (2017). Microbial volatile compounds alter the soil microbial community. Environmental Science and Pollution Research, 24(28), 22485-22493.

Zhang, L., Lim, E. Y., Loh, K. C., Ok, Y. S., Lee, J. T., Shen, Y., et al. (2020). Biochar enhanced thermophilic anaerobic digestion of food waste: Focusing on biochar particle size, microbial community analysis and pilot-scale application. Energy Conversion and Management, 209, 112654.

Zhang, W., Wu, X., Liu, G., Dong, Z., Zhang, G., Chen, T., & Dyson, P. J. (2014). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity within different alpine grassland ecosystems of the Qinghai-Tibet Plateau, China. Environmental earth sciences, 72(3), 779-786.

Zhilina, T. N., Zavarzina, D. G., Kolganova, T. V., Lysenko, A. M., & Tourova, T. P. (2009). Alkaliphilus peptidofermentans sp. nov., a new alkaliphilic bacterial soda lake isolate capable of peptide fermentation and Fe (III) reduction. Microbiology, 78(4), 445-454.

Zhou, J. J., Shen, J. T., Wang, X. L., Sun, Y. Q., & Xiu, Z. L. (2020). Metabolism, morphology and transcriptome analysis of oscillatory behavior of Clostridium butyricum during long-term continuous fermentation for 1, 3-propanediol production. Biotechnology for Biofuels, 13(1), 1-18.

Zhou, J., He, Q., Hemme, C. L., Mukhopadhyay, A., Hillesland, K., Zhou, A., et al. (2011). How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. Nature Reviews Microbiology, 9(6), 452-466.

Tabla S1. Número de secuencias y porcentaje de géneros bacterianos presentes en diferentes muestras del biofertilizante (ordenados de mayor abundancia a menor) obtenidas mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA empleándose la tecnología Illumina.

Organism	Número de secuencias	Porcentaje
Lactobacillus	194263	21.5500
Defluviitoga	122828	13.6256
Acholeplasma	74810	8.2988
Pelotomaculum	71307	7.9102
Proteiniphilum	69155	7.6715
Caldicoprobacter	56171	6.2312
Acetomicrobium	55560	6.1634
Tepidanaerobacter	41707	4.6266
Syntrophaceticus	30522	3.3859
Clostridium	18595	2.0628
Gelria	16653	1.8474
Cryptanaerobacter	11233	1.2461
Paenibacillus	10720	1.1892
Breznakia	10449	1.1591
Alkaliphilus	8628	0.9571
Tepidimicrobium	8552	0.9487
Moorella	6477	0.7185
Desulfonispora	5633	0.6249
Lutaonella	5563	0.6171
Maledivibacter	4660	0.5169
Desulfothermobacter	4658	0.5167
Urmitella	4654	0.5163
Christensenella	3454	0.3832
Rhabdanaerobium	3311	0.3673
Thermoanaerobacter	3022	0.3352
Ethanoligenens	2865	0.3178
Hungateiclostridium	2802	0.3108
Lutispora	2680	0.2973
Garciella	2509	0.2783
Sporanaerobacter	2240	0.2485
Irregularibacter	1880	0.2086
Aminobacterium	1836	0.2037
Gracilibacter	1618	0.1795
Hydrogenispora	1611	0.1787
Proteiniborus	1539	0.1707
Fermentimonas	1501	0.1665

Erysipelothrix	1398	0.1551
Brassicibacter	1390	0.1542
Actinomyces	1380	0.1531
Petrimonas	1377	0.1528
Caloranaerobacter	1325	0.1470
Tindallia	1264	0.1402
Traorella	1232	0.1367
Syntrophomonas	1140	0.1265
Vicinamibacter	1043	0.1157
Haloplasma	1025	0.1137
Pleomorphochaeta	1003	0.1113
Caloramator	876	0.0972
Thermoclostridium	856	0.0950
Labilibacter	755	0.0838
Bacillus	743	0.0824
Natranaerobaculum	649	0.0720
Syntrophothermus	593	0.0658
Adhaeribacter	588	0.0652
Sedimentibacter	564	0.0626
Ruminiclostridium	563	0.0625
Ammonifex	546	0.0606
Oligosphaera	534	0.0592
Ercella	520	0.0577
Thermoactinomyces	466	0.0517
Enterococcus	439	0.0487
Saccharofermentans	432	0.0479
Tissierella	428	0.0475
Vibrio	401	0.0445
Bacteroides	396	0.0439
Paraburkholderia	391	0.0434
Calderihabitans	390	0.0433
Virgibacillus	370	0.0410
Flavonifractor	368	0.0408
Desulfosporosinus	354	0.0393
Herbinix	340	0.0377
Intestinimonas	330	0.0366
Pseudoramibacter	326	0.0362
Sphingobacterium	326	0.0362
Hydrogenibacillus	322	0.0357
Desulfitibacter	318	0.0353
Sphaerochaeta	311	0.0345
Dethiobacter	276	0.0306
Aminipila	268	0.0297
Maribellus	265	0.0294
Acetobacter	262	0.0291
Phocea	260	0.0288

Thermacetogenium	256	0.0284
Dehalobacter	240	0.0266
Victivallis	221	0.0245
Lentimicrobium	172	0.0191
Turicibacter	169	0.0187
Arthrobacter	165	0.0183
Desulfohalotomaculum	164	0.0182
Ralstonia	164	0.0182
Prosthecobacter	163	0.0181
Kiritimatiella	160	0.0177
Sulfurospirillum	155	0.0172
Acinetobacter	153	0.0170
Anoxynatronum	147	0.0163
Egibacter	147	0.0163
Fastidiosipila	140	0.0155
Desulfallas	139	0.0154
Mariniphaga	138	0.0153
Caproiciproducens	136	0.0151
Trichococcus	132	0.0146
Cloacibacillus	115	0.0128
Alkalibacterium	113	0.0125
Marinilactibacillus	108	0.0120
Halothermothrix	104	0.0115
Finegoldia	98	0.0109
Butyricicoccus	85	0.0094
Limnochorda	82	0.0091
Gimesia	80	0.0089
Desulfovibrio	79	0.0088
Anaerobacterium	77	0.0085
Natranaerovirga	75	0.0083
Polycladomyces	75	0.0083
Abyssisolibacter	71	0.0079
Defluviitalea	70	0.0078
Anaerotruncus	66	0.0073
Pseudomonas	64	0.0071
Anaerovorax	61	0.0068
Natranaerobius	60	0.0067
Oblitimonas	59	0.0065
Desulfobulbus	55	0.0061
Caldanaerovirga	50	0.0055
Corynebacterium	49	0.0054
Streptococcus	44	0.0049
Syntrophobotulus	44	0.0049
Caminicella	43	0.0048
Pseudoclostridium	41	0.0045
Butyricimonas	37	0.0041

Pelospora	37	0.0041
Eubacterium	36	0.0040
Alkalibaculum	33	0.0037
Staphylococcus	33	0.0037
Desulfofundulus	31	0.0034
Escherichia	30	0.0033
Halocella	30	0.0033
Olsenella	30	0.0033
Anaeromassilibacillus	23	0.0026
Micrococcus	22	0.0024
Monoglobus	22	0.0024
Desulfitobacterium	21	0.0023
Castellaniella	19	0.0021
Oxobacter	19	0.0021
Paracoccus	19	0.0021
Sphingomonas	18	0.0020
Abyssivirga	17	0.0019
Alkalibacter	17	0.0019
Gaiella	17	0.0019
Cutibacterium	16	0.0018
Erysipelatoclostridium	16	0.0018
Pontibacillus	16	0.0018
Sporomusa	16	0.0018
Aerosakkonema	15	0.0017
Myroides	15	0.0017
Chthoniobacter	13	0.0014
Streptomyces	13	0.0014
Paenalcaligenes	12	0.0013
Prevotella	12	0.0013
Pseudoflavonifractor	12	0.0013
Ruminococcus	12	0.0013
Aminivibrio	11	0.0012
Desulfuribacillus	11	0.0012
Lactococcus	11	0.0012
Pediococcus	11	0.0012
Sporobacter	11	0.0012
Carboxydocella	10	0.0011
Haemophilus	10	0.0011
Papillibacter	10	0.0011
Pseudogracilibacillus	10	0.0011
Raoultibacter	10	0.0011
Thioprofundum	10	0.0011
Calditerricola	9	0.0010
Mahella	9	0.0010
Oceanobacillus	9	0.0010
Psychrobacillus	9	0.0010

Sulfuritalea	9	0.0010
Thermomarinilinea	9	0.0010
Weissella	9	0.0010
Anaerocolumna	8	0.0009
Flintibacter	8	0.0009
Serratia	8	0.0009
Shinella	8	0.0009
Solirubrobacter	8	0.0009
Acidovorax	7	0.0008
Angustibacter	7	0.0008
Dehalococcoides	7	0.0008
Methylobacterium	7	0.0008
Rhodopseudomonas	7	0.0008
Thermovirga	7	0.0008
Bradyrhizobium	6	0.0007
Desulfuromonas	6	0.0007
Hydrotalea	6	0.0007
Microvirga	6	0.0007
Pseudarthrobacter	6	0.0007
Pseudoclavibacter	6	0.0007
Pusillimonas	6	0.0007
Thermostilla	6	0.0007
Aciditerrimonas	5	0.0006
Arcobacter	5	0.0006
Brumimicrobium	5	0.0006
Curvibacter	5	0.0006
Geobacillus	5	0.0006
Geofilum	5	0.0006
Ilumatobacter	5	0.0006
Leucobacter	5	0.0006
Novosphingobium	5	0.0006
Peredibacter	5	0.0006
Pseudolabrys	5	0.0006
Rhizobium	5	0.0006
Rubrobacter	5	0.0006
Thiofaba	5	0.0006
Williamwhitmania	5	0.0006
Acetanaerobacterium	4	0.0004
Aquihabitans	4	0.0004
Calculibacillus	4	0.0004
Capnocytophaga	4	0.0004
Colidextribacter	4	0.0004
Desulfotomaculum	4	0.0004
Desulfurispora	4	0.0004
Dethiosulfatibacter	4	0.0004
Dietzia	4	0.0004

Lihuaxuella	4	0.0004
Lysinibacillus	4	0.0004
Microbacterium	4	0.0004
Nocardioides	4	0.0004
Parvimonas	4	0.0004
Peptoniphilus	4	0.0004
Rothia	4	0.0004
Skermanella	4	0.0004
Sphaerobacter	4	0.0004
Tepidibacter	4	0.0004
Thermanaerovibrio	4	0.0004
Treponema	4	0.0004
Actinomadura	3	0.0003
Anaerofustis	3	0.0003
Armatimonas	3	0.0003
Bactoderma	3	0.0003
Bdellovibrio	3	0.0003
Blastococcus	3	0.0003
Blautia	3	0.0003
Caulobacter	3	0.0003
Citrobacter	3	0.0003
Dendrosporobacter	3	0.0003
Desulfocucumis	3	0.0003
Eoetvoesia	3	0.0003
Gemella	3	0.0003
Gordonibacter	3	0.0003
Ilyobacter	3	0.0003
Leifsonia	3	0.0003
Lishizhenia	3	0.0003
Moraxella	3	0.0003
Petrothermobacter	3	0.0003
Pyramidobacter	3	0.0003
Savagea	3	0.0003
Sediminibacterium	3	0.0003
Solitalea	3	0.0003
Sphingorhabdus	3	0.0003
Stenotrophobacter	3	0.0003
Tannerella	3	0.0003
Acetoanaerobium	2	0.0002
Acidaminobacter	2	0.0002
Actinoplanes	2	0.0002
Actinotalea	2	0.0002
Aeromicrobium	2	0.0002
Aeromonas	2	0.0002
Aggregatibacter	2	0.0002
Agromyces	2	0.0002

Alcaligenes	2	0.0002
Alloprevotella	2	0.0002
Anaerolinea	2	0.0002
Butyratibacter	2	0.0002
Butyrivibrio	2	0.0002
Caecibacterium	2	0.0002
Caldalkalibacillus	2	0.0002
Cellulosilyticum	2	0.0002
Chitinophaga	2	0.0002
Desulfosporomusa	2	0.0002
Dialister	2	0.0002
Enteractinococcus	2	0.0002
Flavobacterium	2	0.0002
Fodinicurvata	2	0.0002
Fusobacterium	2	0.0002
Gemmatimonas	2	0.0002
Heliobacterium	2	0.0002
Hyphomicrobium	2	0.0002
Kocuria	2	0.0002
Lawsonella	2	0.0002
Leptothrix	2	0.0002
Leptotrichia	2	0.0002
Longivirga	2	0.0002
Luteitalea	2	0.0002
Lysobacter	2	0.0002
Massilia	2	0.0002
Methanomassiliicoccus	2	0.0002
Methylomusa	2	0.0002
Microaerobacter	2	0.0002
Microbulbifer	2	0.0002
Microlunatus	2	0.0002
Mitsuokella	2	0.0002
Muricomes	2	0.0002
Mycolicibacterium	2	0.0002
Natronovirga	2	0.0002
Niastella	2	0.0002
Nitrosospira	2	0.0002
Nosocomiicoccus	2	0.0002
Oligella	2	0.0002
Oscillibacter	2	0.0002
Pedobacter	2	0.0002
Propionimicrobium	2	0.0002
Propionispora	2	0.0002
Rectinema	2	0.0002
Reyranella	2	0.0002
Rhodococcus	2	0.0002

Rhodoplanes	2	0.0002
Roseisolibacter	2	0.0002
Sporosalibacterium	2	0.0002
Stackebrandtia	2	0.0002
Symbiobacterium	2	0.0002
Syntrophococcus	2	0.0002
Thermodesulfitimonas	2	0.0002
Thermoflavimicrobium	2	0.0002
Thermosporothrix	2	0.0002
Wukongibacter	2	0.0002
Xanthomonas	2	0.0002