



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Dinámica de la comunidad microbiana de un suelo enmendado con un biofertilizante orgánico en
plantas de maíz (*Zea mays L.*)**

Tesis que presenta

LAURA NATALI AFANADOR BARAJAS

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: Dr. **LUC J. DENDOOVEN**

Ciudad de México

Junio de 2021

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis Doctoral se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología de suelos del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del centro de investigación y estudios avanzados del IPN CINVESTAV, en la Ciudad de México. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento, a través de la beca de Doctorado Nacional CVU 824263.

Quiero darle en especial las gracias a mi director de tesis el Dr Luc Dendooven, por su apoyo, asesoría y todas sus recomendaciones fueron vitales para culminar este trabajo.

También mi gran agradecimiento, a mi comité tutorial conformado por el Dr. Rodolfo Marsch Moreno, Dr Frederic Thalasso, Dra Marina Olivia Franco, Dra María Soledad Vásquez y la Dra Yendi Navarro. Gracias por todos sus comentarios para ayudar a mejorar este proyecto de investigación.

Gracias a Marco Luna y Blanca Ramírez por todo su apoyo en el laboratorio y en la logística, por sus sonrisas y todo su cariño.

Es muy grato agradecerles a todos mis compañeros del laboratorio, gracias por ayudarme y guiarme, su gran apoyo fue indispensable para terminar este trabajo: Stephanie Hereira, Gabriela Medina, Shona Prince, Claudia Ibarra, Viviana Rodríguez, Arit León, Mario Hernández, Nina Montoya y Selene Gómez.

A todos los estudiantes que pasaron por el laboratorio prestando su servicio social y verano científico, fueron parte importante para desarrollar este trabajo, muchas gracias a todos.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis primero a Dios por darme tanta luz en el camino, y por su guía y cariño. Gracias a su amor infinito.

A mi esposo, dedico cada uno de mis logros, gracias a él por dejarlo todo y acompañarme en este maravilloso sueño de seguir formándome como investigadora, infinitas gracias.

A mi familia por apoyarme en la distancia y escucharme en los momentos difíciles y a mis amigos que son la familia que elegí gracias, por tanto.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	1
DEDICATORIA	2
CONTENIDO	3
LISTA DE TABLAS.....	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT:.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 El Suelo y su importancia en la diversidad biológica.....	10
1.2 Papel de los Biofertilizantes en la agricultura orgánica.....	12
1.3 Cultivo de Maíz, fertilización y microbioma.....	15
1.4 Supervivencia de microorganismos en el suelo.....	16
2. Justificación.....	20
3. Objetivo General	21
3.1 Objetivos Específicos	21
4. Metodología.....	21
4.1 Muestreo de Suelo y Biofertilizante	21
4.2 Características fisicoquímicas del suelo y Biofertilizante	22
4.3. Experimento en Invernadero	23
4.4 Extracción de DNA del Biofertilizante y suelo	25
4.5. Amplificación por PCR de los marcadores 16S rRNA (V3-V4).....	25
4.6. Análisis de datos de las secuencias 16S rDNA	26
4.7. Análisis Estadístico	26
5. Resultados	27
5.1 <i>Caracterización del biofertilizante, suelo y planta de maíz</i>	<i>27</i>
5.2 <i>Características del biofertilizante y su estructura de la comunidad bacteriana.....</i>	<i>30</i>
5.3 <i>Curvas de Rarefacción y diversidad alfa</i>	<i>33</i>
5.4 <i>Efecto de la aplicación del biofertilizante o biofertilizante estéril sobre la comunidad bacteriana.....</i>	<i>35</i>
5.5 <i>Efecto del cultivo de maíz sobre la estructura de la comunidad microbiana.....</i>	<i>41</i>

<i>5.6 Efecto combinado de la aplicación del biofertilizante y el cultivo de maíz sobre la estructura de la comunidad bacteriana</i>	42
6. Discusión	43
7. Conclusión	49
8. Recomendaciones	49
9. Referencias:	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores que influncian la supervivencia bacteriana en el suelo (van Veen, van Overbeek, and van Elsas 1997) _____	17
Tabla 2. Caracterización Fisicoquímica inicial del suelo _____	22
Tabla 3. Caracterización Fisicoquímica del Biofertilizante _____	27
Tabla 4. Dinámica de N mineral y pH en el suelo con y sin planta de maíz de aplicar los tratamientos C (sin biofertilizante), B (con biofertilizante), BE (con biofertilizante estéril) en los tres tiempos de muestreo (44, 89 y 130 días), concentración de nitrito NO ₂ ⁻ , concentración de nitrato NO ₃ ⁻ y concentración de amonio NH ₄ ⁺ (mg N kg ⁻¹ suelo). _____	28
Tabla 5. Características de las plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>) en suelos sin biofertilizante, con biofertilizante o biofertilizante estéril después de 44, 89 y 130 días. _____	29
Tabla 6. Valores de diversidad Alfa en el suelo sin cultivar, no rizosférico y en la rizósfera de las plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>) en los tratamientos sin biofertilizante (C), con biofertilizante (B) y con biofertilizante estéril (BE) después de 89 y 30 días. _____	34
Tabla 7. Índices de diversidad alfa y el efecto del tratamiento (C, B, o BE) y cultivo de planta (sc, nr y riz) en el suelo de plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>) _____	34
Tabla 8. Análisis de perMANOVA sobre el efecto del cultivo de maíz (Sin cultivar, no rizosférico o rizósfera), Tiempo (día 89 y 130) y su interacción, la aplicación del biofertilizante (Sin Biofertilizante, Biofertilizante o Biofertilizante estéril), Tiempo y su interacción, aplicación del biofertilizante, localización y su interacción sobre la estructura de la comunidad bacteriana considerando los phyla y todos los géneros asignados _____	43
Tabla 9. Efecto de la aplicación del biofertilizante (C, B, BE) sobre los grupos bacterianos en el suelo no rizosférico y la rizósfera usando un acercamiento composicional, usando un análisis de abundancia diferencial y teniendo en cuenta la variación de muestras (paquete ALDEx2, Gloor et al., 2019). _____	46
Tabla 10. Efecto de la aplicación del biofertilizante (C, B, BE) sobre los grupos bacterianos en el suelo sin cultivar, no rizosférico y rizósfera (sc, nr, riz) usando un análisis composicional (paquete ALDEx2, Gloor et al., 2019). _____	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama sistemático del microbioma de la rizósfera: las ventajas, desventajas y lo peligroso de los microorganismos en las inmediaciones de la raíz, y los factores que afectan los exudados de la raíz y la flora microbiana (Modificado de Ali et al., 2017). _____ 11
- Figura 2.** Diseño experimental en el invernadero y toma de muestras _____ 24
- Figura 3.** Mapa de calor los principales phyla cada tratamiento (control sin biofertilizante, con biofertilizante y con biofertilizante estéril) y localización en el suelo (sin cultivar y cultivado: no rizosférico y rizósfera) en los tiempos de muestreo (T1= 44 días, T2= 89 días y T3 =130 días) _____ 30
- Figura 4.** Mapa de calor de los primeros 50 géneros bacterianos en cada tratamiento (control sin biofertilizante, con biofertilizante y con biofertilizante estéril) y localización en el suelo (sin cultivar y cultivado: no rizosférico y rizósfera) en el muestreo (T1= 44 días, T2= 89 días y T3 =130 días) _____ 32
- Figura 5.** Curvas de rarefacción en los tratamientos en el número de OTUS _____ 33
- Figura 6.** Razón de cambio de la abundancia relativa de los 50 géneros bacterianos más representativos en el suelo tratado con biofertilizante después de 44 días (□), 89 días (□) y 130 días (□) o biofertilizante estéril después de 44 días (○), 89 días (●) y 130 días (●) o biofertilizante estéril después de 44 días (□), 89 días (■) y 130 días (■) versus el suelo sin biofertilizante (a) suelo sin cultivar, (b) suelo no rizosférico y (c) rizósfera. _____ 36
- Figura 7.** Análisis de componentes principales en el día 130 para los phyla de bacterias identificadas en el gen 16S rRNA para los tratamientos Control sin biofertilizante (C) (blanco), Biofertilizante (B) (negro) y Biofertilizante Estéril (BE) (gris), y según la localización en el suelo muestreado: □ Suelo no rizosférico (nr), ○ Suelo sin cultivar (s), Δ Suelo rizosférico (r). _____ 37
- Figura 8.** Análisis de componentes principales en el día 130 para los 50 primeros géneros de bacterias identificadas en el gen 16S rRNA para los tratamientos: Control sin biofertilizante (C) (blanco), Biofertilizante (B) (negro) y Biofertilizante estéril (BE) (gris), y según la localización en el suelo muestreado: □ Suelo no rizosférico (nr), ○ Suelo sin cultivar (s), Δ Suelo rizosférico (r). _____ 38
- Figura 9.** Cladograma a partir del análisis de LEfSe para los principales 50 géneros presentes en el biofertilizante que ilustran la variación de los diferentes grupos taxonómicos presentes en la comunidad bacteriana del suelo tratado con Biofertilizante (B) y el suelo control sin biofertilizante (C) en las diferentes localizaciones del suelo como s (sin cultivar), nr (no rizosférico), r (rizósfera), para los tres días de muestreo a los 44 días (a), 89 días (b), y 130 días (c). Las diferencias de color están representadas por el tratamiento y localización de suelo. _____ 39
- Figura 10.** Análisis de componentes principales (PCA) con las phyla de bacteria en el suelo a) sin biofertilizante, b) biofertilizante y c) biofertilizante estéril con el suelo sin cultivar en el día 44 (□), día 89 (○) y día 130 (△), en el suelo no rizosférico en el día 44 (■), día 89 (●) y día 130 (▲), y en la rizósfera en el día 44 (■), día 89 (●) y día 130 (▲). _____ 40
- Figura 11.** Razón de cambio en la abundancia relativa de los 50 géneros bacterianos en los tratamientos (a) sin biofertilizante, (b) biofertilizante y (c) biofertilizante estéril. En el suelo no rizosférico después de 44 días (○), 89 días (●) y 130 días (●) o rizósfera después de 44 días (□), 89 días (■) y 130 días (■) versus el suelo sin cultivar _____ 41
- Figura 12.** Análisis de componentes principales (PCA) con todos los grupos bacterianos asignados para el nivel de género después de (a) 89 días y (b) 130 días en el suelo sin biofertilizante (□), suelo no cultivado con biofertilizante (○) y suelo no cultivado enmendado con biofertilizante estéril (△), suelo no rizosférico con biofertilizante (■) suelo no rizosférico con biofertilizante (●) y suelo no rizosférico con biofertilizante estéril (▲) y suelo de rizósfera sin biofertilizante (■), suelo de rizósfera con biofertilizante (●) y suelo de rizósfera con biofertilizante estéril (▲) _____ 43

ABREVIATURAS

B	Biofertilizante
BE	Biofertilizante estéril
C	Sin Biofertilizante
CE	Conductividad electrolítica
CRA	Parámetro de capacidad de retención de agua en el suelo
dS m⁻¹	deciSiemens por metro
LEFSE	Análisis del efecto del tamaño
OTU	Unidades taxonómicas operacionales
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
pH	Potencial de hidrógeno
rRNA 16S	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal 16S

RESUMEN

En la agricultura orgánica es común la aplicación de microorganismos en los cultivos para estimular el crecimiento vegetal, aumentar la producción y disminuir el uso fertilizante como N inorgánico. Sin embargo, es importante evidenciar que hay sobrevivencia y proliferación de estos microorganismos alóctonos que son aplicados en el suelo y correlacionarlos con el crecimiento vegetal. Por esto, el objetivo de este estudio evaluó el efecto de la aplicación de un consorcio bacteriano no comercial como biofertilizante del maíz (*Zea mays L*) en un experimento en invernadero. Se realizó un experimento en columnas con suelo sin cultivar y en otras se hizo la siembra de maíz, se aplicó el biofertilizante sin esterilizar, estéril, y un control sin biofertilizante. Se evaluó el crecimiento vegetal y las comunidades bacterianas en el suelo después de 44, 89 y 130 días. No se encontró un efecto significativo en el crecimiento del maíz por el uso del biofertilizante. La comunidad del consorcio aplicado en el suelo fue dominada por el género *Lactobacillus* (11.9 % abundancia relativa). El efecto de la aplicación del consorcio o el biofertilizante estéril en las comunidades bacterianas del suelo mostraron un pequeño cambio en la abundancia relativa en un número limitado de taxa de bacterias como *Delftia*, *Halomonas*, *Lactobacillus* y *Stenotrophomonas*, sin alterar significativamente la estructura de la comunidad. Se encontró que el cultivo de maíz afectó significativamente la estructura de la comunidad bacteriana lo cual mostró variaciones grandes y significativas en el tiempo en el suelo cultivado y sin cultivar. Es importante recordar que este experimento se realizó en invernadero, por lo cual resultaría interesante poder probar el impacto de este biofertilizante con experimentos en campo. Como conclusión las bacterias aplicadas como biofertilizante tuvieron un efecto limitado sobre la abundancia relativa de estos grupos en suelos sin cultivar o suelos cultivados con maíz.

ABSTRACT:

In organic agriculture, it is common to apply microorganisms to crops to stimulate plant growth, increase production, and reduce the use of fertilizers such as inorganic N. However, it is important to confirm that there is survival and proliferation of these allochthonous microorganisms that are applied to the soil and correlate such activities with plant growth. The aim in the study was to evaluate the effect of the application of a non-commercial bacterial consortium as a biofertilizer for corn (*Zea mays L*) in a greenhouse experiment. The experiment was carried out in columns with uncultivated and cultivated soil with corn. Sterilized and unsterilized biofertilizer were applied to soil; there was also a control without biofertilizer. Plant growth and bacterial communities in the soil were evaluated after 44, 89 and 130 days. No significant effect was noted in corn growth with biofertilizer application. The consortium community applied to the soil was dominated by the genus *Lactobacillus* (11.9% relative abundance). The effect of the application of the consortium or the sterile biofertilizer on the relative abundance of bacterial communities was minimal, with only a limited number of bacterial taxa such as *Delftia*, *Halomonas*, *Lactobacillus* and *Stenotrophomonas* showing change. Bacterial community structure was not significantly altered. It was found that the cultivation of corn significantly affected bacterial community structure, which showed large and significant variations over time in cultivated and uncultivated soil. It is important to bear in mind that this experiment was carried out in a greenhouse, so it would be interesting to be able to test the impact of this biofertilizer in field experiments. In conclusion, the relative abundance of the bacterial groups that were in the applied biofertilizer was almost unchanged in uncultivated or cultivated soils.

1. Introducción

1.1 El Suelo y su importancia en la diversidad biológica

Si bien el suelo se conoce con frecuencia como el "sustrato fértil", no todos los suelos son adecuados para cultivos. Los suelos ideales para la agricultura se equilibran en las contribuciones de los componentes minerales (arena: 0.05-2 mm, limo: 0.002-0.05 mm, arcilla: <0.002 mm), materia orgánica del suelo (SOM), aire y agua. Las contribuciones equilibradas de estos componentes permiten la retención de agua y el drenaje, oxígeno en la zona de la raíz, nutrientes para facilitar el crecimiento del cultivo; y proporcionan apoyo físico para las plantas (Parikh and James 2012). La salud del suelo fue definido como "la capacidad del Suelo para funcionar como un sistema vital para mantener la productividad biológica, promoviendo la calidad del ambiente y promoviendo la salud vegetal y animal"(Doran and Zeiss 2000).

El suelo es el lugar en la tierra donde existe la mayor parte de la biodiversidad, y la rizósfera probablemente represente el hábitat más dinámico de la Tierra; y ciertamente es la zona más importante en términos de definición de la calidad y cantidad del recurso humano terrestre. A pesar de su importancia central para toda la vida, sabemos muy poco sobre el funcionamiento de la rizósfera y tenemos una ignorancia extraordinaria sobre la mejor manera de manipularla para nuestro beneficio (Hinsinger et al. 2009). La rizósfera es la porción de suelo que está expuesta a la actividad de la raíz. Es un punto clave para la actividad microbiana, que ayuda al crecimiento vegetal en diversas formas. Es la porción de suelo conectado a la raíz y ocasionalmente extendida por pocos milímetros desde el sistema radicular, está incluida en la rizósfera que sirve como una zona importante a nivel ecológico para estudiar las interacciones microbianas y la planta (Richter et al. 2007; Gray and Smith 2005).

El término microbioma rizosférico se refiere al conjunto de comunidades microbianas asociadas con la rizósfera de la planta. Biológicamente, el microbioma rizosférico contiene una gran cantidad de comunidades microbianas que interactúan con las plantas de forma diferente (Ali et al. 2017). En general, se cree que la gran diversidad de las comunidades microbianas asociadas con el rizoplaneo en la rizósfera, ayuda a las plantas a adquirir minerales, sustancias orgánicas y muchos otros metabolitos, incluidos aminoácidos, fitohormonas, etc., para mejorar la productividad de la planta (Ferreira and de Melo 2010).

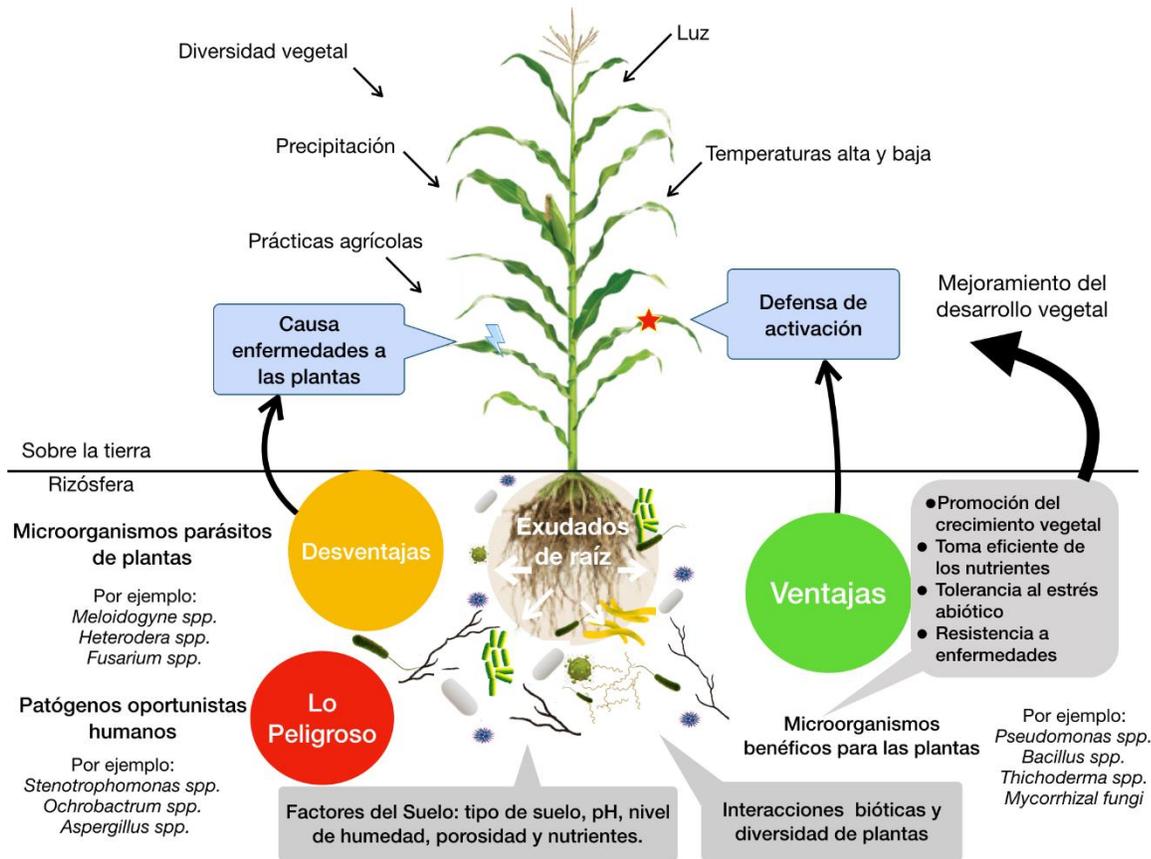


Figura 1. Diagrama sistemático del microbioma de la rizósfera: las ventajas, desventajas y lo peligroso de los microorganismos en las inmediaciones de la raíz, y los factores que afectan los exudados de la raíz y la flora microbiana (Modificado de Ali et al., 2017).

Para esquematizar el papel de los microorganismos en la rizósfera, en la Figura 1 se muestra un diagrama donde se muestra la forma en la que interactúan los organismos que conforman el microbioma en este ambiente. Entre las ventajas se encuentran los microorganismos benéficos para las plantas ya que pueden ser la defensa de activación para prevenir enfermedades. Entre sus ventajas están la promoción del crecimiento de las plantas, ayudando a la absorción de nutrientes en las plantas, el antagonismo a los patógenos de las plantas y la tolerancia de las plantas contra el estrés abiótico. Sin embargo, las desventajas son las bacterias, hongos parásitos de plantas y nemátodos que causan enfermedades de importancia económica en plantas de los principales cultivos y resultan en serios problemas de reducción de la productividad y seguridad alimentaria. Del mismo modo, algunos microorganismos de la rizósfera tienen la oportunidad de invadir el cuerpo humano a través de diferentes vías y

causar enfermedades infecciosas. Esto podría ser considerado como lo peligroso, ya que son los organismos más perjudiciales en la naturaleza (Ali et al. 2017).

Gracias al desarrollo tecnológico como las plataformas de secuenciación NGS (Next Generation Sequencing) se ha logrado describir la diversidad biológica que se alberga en la rizósfera del suelo, además de mostrar la influencia de la planta sobre la estructura de la comunidad microbiana y viceversa. Se ha reportado una gran variedad de bacterias rizosféricas. Entre los grupos taxonómicos se destacan principalmente Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria y Bacteroidetes (Peiffer et al. 2013; Uroz et al. 2013).

1.2 Papel de los Biofertilizantes en la agricultura orgánica

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos en la agricultura ha tenido como resultado efectos adversos en la pérdida de la salud y la calidad del suelo, haciéndolos no aptos para los cultivos. Esto, ha llevado a la búsqueda de sistemas agrícolas que sean sostenibles (Megali, Glauser, and Rasmann 2013). La aplicación prolongada de fertilizantes químicos reduce la riqueza microbiana y promueve una disminución de la microbiota del suelo con características benéficas (Sun et al. 2015). La agricultura orgánica está ganando aceptación mundial y se ha expandido a una tasa anual del 20% en la última década, representando más de 24 millones de hectáreas en todo el mundo. Las prácticas orgánicas evitan las aplicaciones de fertilizantes y pesticidas sintéticos, dependen de insumos orgánicos y reciclaje para el suministro de nutrientes, y enfatizan el diseño del sistema de cultivo y los procesos biológicos para el manejo de plagas, según lo define la regulación de agricultura orgánica en el mundo. La acumulación de una biomasa microbiana del suelo grande y activa es un conjunto importante de nutrientes accesibles, por lo tanto, es una prioridad importante en la agricultura orgánica. En la agricultura orgánica, existe un efecto positivo de la cantidad y calidad de los insumos de los residuos orgánicos en la biomasa microbiana del suelo. De esta manera, los sistemas orgánicos son extremadamente importantes para el aumento de la fertilidad del suelo y el mantenimiento de la sostenibilidad ambiental (Ferreira and de Melo 2010).

Los biofertilizantes contienen microorganismos y se aplican a semillas, raíces, plantas o suelo para promover el crecimiento vegetal. Suministran nutrientes esenciales, como nitrógeno y fósforo (Reddy and Saravanan 2013). La aplicación de biofertilizantes ha aumentado en las prácticas agrícolas, ya que pueden contribuir al rendimiento sostenible y seguridad alimentaria (Bhardwaj et al. 2014). Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas

(PGPR) a menudo se incluyen en los biofertilizantes. Estas bacterias pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos que mejoran la solubilización de nutrientes minerales, la producción de fitohormonas, estimulando el crecimiento de las raíces y la supresión de enfermedades radiculares (Martínez-Viveros et al. 2010). Sin embargo, se han reportado incoherencias en el rendimiento en campo de estos biofertilizantes, posiblemente por la no adaptabilidad al suelo no nativo, los efectos negativos de la interacción con los microorganismos autóctonos de los cultivos y la incompatibilidad en la colonización de diferentes huéspedes de cultivos, especies y variedades (Sruthilaxmi and Babu 2017). Cuando se introducen bacterias, al ser inoculadas declinan rápidamente, una de las posibles causas podría ser la competencia (Cummings 2009). No se conoce con claridad qué interacciones ecológicas ocurren entre estos microorganismos y su impacto, por lo cual, no es posible predecir con eficacia el efecto de los biofertilizantes (Malusà, Pinzari, and Canfora 2016).

Dado que los inoculantes microbianos tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, el enriquecimiento de nutrientes, la absorción y el mantenimiento de la salud de las plantas, se los designa como una parte prometedora de las soluciones integradas para los problemas agroambientales (Kumar et al. 2016). Los biofertilizantes se definen como "sustancias que contienen microorganismos vivos, que cuando se aplican a semillas, plantas o suelos y promueven el crecimiento mediante el suministro de nutrientes esenciales como nitrógeno (N), fósforo (P) y otros nutrientes minerales" (Reddy and Saravanan 2013). Los biofertilizantes pueden ser aplicados a las semillas, la superficie de las plantas o el suelo. Su principal función es colonizar la rizósfera o el interior de la planta, y promover el crecimiento aumentando la oferta o disponibilidad de nutrientes primarios a la planta huésped. En el contenido de los principales biofertilizantes comerciales se encuentran *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azolla*, *Acetobacter* y *Azospirillum*, que son aplicados en diversos cultivos de cereales y hortalizas (Pathak and Kumar 2016).

Se ha demostrado que las inoculaciones con consorcios microbianos o rizobacterias (PGPR) mejoran la eficiencia del uso de nutrientes, es decir, principalmente P, N y C. La mayor eficiencia en el uso de nutrientes beneficia a la planta por inducción en la germinación de la semilla, el rendimiento de la planta y una mayor absorción de nutrientes junto con la mejora en la altura de la planta y un control biológico efectivo (Ferreira and de Melo 2010). Numerosos investigadores han desarrollado inoculantes microbianos que confieren propiedades

beneficiosas, como la fijación de nitrógeno, la absorción de P y otros nutrientes minerales, el control biológico y la producción de hormonas vegetales, para aumentar la productividad de los cultivos (Bashan, Holguin, and Bashan 2004; Miransari 2011; Dodd and Ruiz-Lozano 2012; Bákonyi et al. 2013).

India es uno de los países importantes en producción y consumo de biofertilizantes. Con el fin de fomentar la agricultura orgánica mediante biofertilizantes, dentro de los más usados están *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, bacterias solubilizadoras de fosfato y micorrizas. El consumo promedio en el país es de aproximadamente 45,000 toneladas por año mientras que la producción es menos de la mitad. Es evidente que existe una tremenda brecha entre la demanda anual y la producción de biofertilizantes en todo el mundo, especialmente en la India. Por lo tanto, la combinación sensata de fertilizantes químicos y biofertilizantes también podría tenerse en cuenta por las preocupaciones económicas y ecológicas (Pindi and Satyanarayana 2012).

Existen evidencias de que el uso de biofertilizantes podría ayudar al impulso económico de los países subdesarrollados. En el Estado de Morelos en México, muchos agricultores a escala pequeña ya están aplicando en sus cultivos este tipo de productos biotecnológicos, producidos a partir de los activos tecnológicos endógenos. Esto facilita la comprensión de las percepciones de los campesinos, además de los desafíos y oportunidades que enfrentan las zonas rurales y las conexiones entre la participación de las empresas, la academia y el gobierno en la planificación y administración con respecto a la gestión de estas innovaciones (Barragán-Ocaña and Del-Valle-Rivera 2016).

Uno de los principales inconvenientes en el uso de los biofertilizantes es su calidad, como la mayoría de las agencias productoras privadas que suministran estos productos no se preocupan por los parámetros de calidad. La disponibilidad de biofertilizantes de buena calidad para los agricultores es el principal obstáculo en su éxito. También se ha encontrado que la incoherencia en el rendimiento de campo de los inoculantes microbianos, puede atribuirse a problemas como la adaptabilidad a un suelo no nativo, los efectos negativos de la interacción con los microorganismos autóctonos de los cultivos y la incompatibilidad en la colonización de diferentes huéspedes de cultivos, especies y variedades (Sruthilaxmi and Babu 2017).

1.3 Cultivo de Maíz, fertilización y microbioma

Zea mays L., conocido por su nombre común como maíz, es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género. El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo con mayor producción de grano en el mundo con los principales productores son EE. UU., China, Brasil y México (Ranum, Peña-Rosas, and Garcia-Casal 2014; Alexandratos and Bruinsma 2012). Es el segundo cultivo más producido del mundo después del trigo y es el cereal con mayor rendimiento de grano por hectárea (Paliwal, 2001). Se cree que el maíz, se originó en el centro de México hace 7000 años a partir de una hierba silvestre, y los nativos americanos transformaron el maíz en una mejor fuente de alimento. El maíz contiene aproximadamente 72% de almidón, 10% de proteína y 4% de grasa, con una densidad energética de 365 Kcal $\times 100$ g⁻¹ y se cultiva en todo el mundo. El maíz se puede procesar en una variedad de productos que incluyen almidón, edulcorantes, aceite, bebidas, pegamento, alcohol industrial y etanol combustible (Ranum, Peña-Rosas, and Garcia-Casal 2014). México es uno de los principales países consumidores de maíz a nivel mundial, ya que éste es la base de su alimentación, además de ser el cultivo más producido en el país y de ocupar el cuarto lugar como productor en el mundo. A pesar de ello, importa 10 millones de toneladas de este grano anualmente (González Merino and Ávila Castañeda 2014).

Para el crecimiento y desarrollo del maíz el N y el P son nutrientes esenciales, por lo cual se usan fertilizantes químicos para reponer el suelo N y P, que puede conllevar a costos ambientales importantes. Por ejemplo, en 2016 México usó 779,9 mil toneladas métricas de fertilizante inorgánico en el cultivo de maíz (Statista 2016). Desafortunadamente, la fertilización química puede conducir a costos ambientales significativos, por ejemplo, la eutrofización de los ríos, y la acidificación y salinización del suelo. En la búsqueda de una alternativa de estos químicos inorgánicos, se han inoculado plantas con las bacterias para mejorar el crecimiento y la producción de grano de maíz, y así reducir la aplicación de fertilizantes (Yazdani et al. 2009; Al-Enazy et al. 2017; Faramarzi et al. 2012).

Aunque la utilidad de los microorganismos utilizados como biofertilizantes en el cultivo de maíz se conoce ampliamente (Barragán-Ocaña and Del-Valle-Rivera 2016; Mohammadi and Yousef Sohrabi 2012; Yazdani et al. 2009) y se ha descrito la supervivencia cultivable (Kozdrój, Trevors, and Van Elsas 2004; Frey-Klett, Pierrat,

and Garbaya 1997; Swapna, Divya, and BrahmaPrakash 2016), se conoce poco sobre cómo los microorganismos añadidos al suelo sobreviven y si podrían alterar la comunidad microbiana del suelo. En una revisión de investigaciones se encontró que la inoculación de microorganismos en el suelo o su aplicación en las semillas puede cambiar la estructura de las comunidades nativas, por lo cual es importante introducir de forma segura microorganismos en el ambiente (Trabelsi et al. 2013).

En una planta de importancia económica como el maíz, es sustancial conocer composición del microbioma de la rizósfera para determinar su afectación por factores fisicoquímicos de la rizósfera o por la genética de la planta. Peiffer et al. (2013) caracterizaron la diversidad bacteriana de la rizósfera en 27 líneas endogámicas de maíz, mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA, y observaron variación sustancial en la riqueza y diversidad bacteriana, y la abundancia relativa de los taxones entre el suelo y la rizósfera del maíz, teniendo como phyla dominantes a Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Cyanobacteria. Otro estudio similar fue realizado por Chauhan et al. (2011) en el cual se evaluaron 274 secuencias de 16S rRNA obtenidas de la estructura rizosférica de maíz, donde los grupos más relevantes fueron Proteobacteria con 48%, 10.3% de Actinobacteria, 9.9% de Bacteroidetes, 6.6% de Verrucomicrobia, 4.8% de Acidobacteria, 1.8% de Firmicutes, 1.5% de Chloroflexi, 1.5% de TM7, 1.1% de Deinococcus-Thermus, 0.7% de Planctomycetes, 0.70% de Gemmatimonadetes y 0.40% de Cyanobacteria. Por último, se estudió la microbiota de la rizósfera de dos genotipos de maíz, i.e. P9714XR y 35F40, en cuatro tipos de suelos; los principales Phyla descritos fueron Crenarchaeota, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Acidobacteria, Planctomycetes y Gemmatimonadetes, los cuales variaron en su abundancia (Bakker et al. 2015).

1.4 Supervivencia de microorganismos en el suelo

Se han sugerido varios mecanismos como las principales causas de la disminución de las poblaciones de inoculantes microbianos en el suelo (Van Elsas, Heijnen, and van Veen 1991; Evans, Wallace, and Dobrowolski 1993). Dependen principalmente de su origen biótico (depredación, competencia y crecimiento de la raíz) y abiótico (minerales de arcilla, tensión del agua, carbono orgánico, nutrientes inorgánicos (N y P), pH, temperatura y desechos tóxicos), de los cuales se puede evidenciar su efecto en la supervivencia de los

microorganismos en la Tabla 1 (van Veen, van Overbeek, and van Elsas 1997). Se sabe que las bacterias al ser inoculadas declinan rápidamente, una de las posibles causas podría ser la competencia con la microbiota del suelo (Cummings 2009). Se presume que los microorganismos podrían ser competidores directos al ocupar el mismo nicho, mientras que otros podrían tener actividades antagónicas o depredadoras.

Tabla 1. Factores que influyen la supervivencia bacteriana en el suelo (van Veen, van Overbeek, and van Elsas 1997)

Origen	Factor	Efecto
Biótico	Depredación	Disminuye el tamaño de la población
	Competencia	Disminuye el tamaño de la población / efecto antagónico sobre los patógenos de planta.
	Crecimiento de raíz	Libera componentes orgánicos y favorece la supervivencia.
Abiótico	Minerales de arcilla	Protección contra la depredación
	Tensión de agua	Alta: escasez de agua, alta osmolaridad; Baja: anaerobiosis, incremento de la disponibilidad de nutrientes por difusión.
	Carbono orgánico	Selección para especies copiotrofas u oligotróficas, el carbono orgánico limitado resulta en reducción de inanición en actividad.
		Limitación de resultados en inanición.
	Nutrientes inorgánicos (N, P)	Es selectivo para las especies, liberación de nutrientes (P) o
	pH	componentes tóxicos (Al^{+3}). Se afectan la actividad metabólica, así como la presión
Temperatura	biótica (depredadora).	

Químicos (desechos tóxicos) Inhibición de organismos sensibles, selección por biodegradabilidad, resistencia o formas tolerantes.

Similarmente, las diversas comunidades microbianas son afectadas en su estructura por las características químicas del suelo (pH, contenido de nutrientes) y físicas (textura) (Malusà, Pinzari, and Canfora 2016). Dentro de los cuales destaca el pH del suelo como uno de los predictores más importante de la estructura de la comunidad bacteriana, con mayor diversidad asociada con suelos neutros y menor diversidad en suelos ácidos, probablemente debido a la tolerancia al crecimiento del pH relativamente estrecha de taxones bacterianos (Fierer and Jackson 2006).

Como se mencionó, al introducir microorganismos (alóctonos) en el suelo, se enfrentan a la competencia de microorganismos autóctonos. Esto sucede al usar biofertilizantes en el suelo. Sin embargo, aún no se conoce con claridad que interacciones ecológicas ocurren entre estos microorganismos en el suelo y el impacto, por lo cual, no es posible predecir con eficacia el efecto de los inoculantes introducidos en los biofertilizantes (Malusà, Pinzari, and Canfora 2016). Existe un gran esfuerzo para evaluar estas relaciones entre microorganismos y su impacto en la eficacia de los biofertilizantes, tanto a corto como a largo plazo. Por esto, se están utilizando métodos como el análisis de la biomasa microbiana del suelo, la actividad microbiana del suelo, la estructura de la comunidad microbiana del suelo y los análisis de diversidad (Trabelsi and Mhamdi 2013).

Es por ello, que es importante investigar si esos microorganismos alóctonos, es decir, introducidos en el suelo, sobrevivirán y estimularán el crecimiento de las plantas. El entorno del suelo es altamente competitivo. Los microorganismos aplicados al suelo podrían no estar físicamente protegidos contra la depredación (Postma, Hok-A-Hin, and van Veen 1990; Jousset et al. 2010; Xiong et al. 2017)] y podría ser que un efecto positivo sea el resultado de los nutrientes liberados después de su depredación. Además, el movimiento de los microorganismos es limitado en el suelo, por lo que puede ser difícil para ellos entrar en contacto con las raíces en crecimiento cuando se aplican en la superficie del suelo. En una investigación en la que se aplicó una sola

cepa de *Bacillus subtilis* con capacidades promotoras del crecimiento de las plantas, no se encontró que esta acelerará el desarrollo de las plantas de girasol (López-Valdez et al. 2011).

De forma similar, Nuzzo et al. (2020) probaron cuatro biofertilizantes comerciales y se evaluó su impacto en el crecimiento de la planta de tomate y las comunidades microbianas del suelo nativo. Se encontró que la mayoría de los microorganismos no estimulaban el crecimiento del tomate, además varios de estos biofertilizantes no presentaban los microorganismos que se esperaban y su persistencia en el suelo fue baja.

2. Justificación

El aumento de la población humana está ejerciendo una gran presión sobre el suelo y los recursos hídricos, lo cual está amenazando nuestra capacidad de producir alimentos, forraje y fibra suficientes. Como resultado, existe un consenso creciente dentro de nuestra comunidad global de que la protección de los recursos naturales y la implementación de prácticas agrícolas sustentables con el ambiente y económicamente sólidas son de máxima prioridad (Parikh and James 2012).

El suelo es la base de los recursos y de la producción de los cultivos, la productividad del trabajo y la factibilidad del establecimiento de sistemas sustentables. En la actualidad, existe la necesidad de investigar si el uso de las soluciones que se han desarrollado para una agricultura orgánica, como lo es el uso de biofertilizantes, tienen un verdadero efecto en un ecosistema tan complejo como es el suelo. Este trabajo de investigación contempla el uso de un biofertilizante orgánico que será evaluado a través del crecimiento vegetal de plantas de maíz, adicionalmente, se hará la estimación de la supervivencia de los microorganismos presentes en un biofertilizante en el tiempo, por medio del uso de herramientas de secuenciación masiva de los microorganismos presentes en el suelo usando los marcadores moleculares de bacterias (rRNA 16S) para su caracterización. Si bien se ha estudiado esto previamente, se ha evaluado principalmente por medio de microorganismos cultivables y en menor medida usando herramientas moleculares como la PCR.

En este caso en particular lo haremos usando la técnica de secuenciación masiva Illumina, en la cual se podrá obtener una mejor caracterización del microbioma del suelo y si hay cambios importantes en la estructura del microbioma del suelo al agregar el biofertilizante. Otro aporte relevante de esta investigación es que contrastará los microorganismos del suelo rizosférico del no rizosférico. Por ejemplo, si hay un grupo taxonómico dominante en el biofertilizante podremos hacer evidente su presencia o no en estos nichos ecológicos del suelo, lo cual será determinante para evaluar su papel en la promoción del crecimiento vegetal. Adicionalmente, el diseño experimental contempla el uso del biofertilizante esterilizado, por medio del cual se

podría evaluar si el biofertilizante promueve el crecimiento solo por los nutrientes y no por los microorganismos presentes.

3. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo consiste en analizar el impacto de la aplicación de un biofertilizante orgánico sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo y su efecto en el crecimiento en plantas de maíz (*Zea mays L.*) a lo largo del tiempo en el suelo rizosférico y no rizosférico.

3.1 Objetivos Específicos

1. Evaluar la diversidad microbiana presente en el biofertilizante y en el suelo inicial mediante la secuenciación de marcadores moleculares como el rRNA 16S para bacterias.
2. Establecer las diferencias principales en la estructura de la comunidad de bacterias en el suelo rizosférico y no rizosférico, luego de aplicar biofertilizante, biofertilizante estéril o sin biofertilizante en el suelo de un cultivo de maíz en invernadero.
3. Determinar el efecto del biofertilizante en el crecimiento de las plantas de maíz después de aplicarlo y compararlo con la abundancia relativa de microorganismos en el suelo.

4. Metodología

4.1 Muestreo de Suelo y Biofertilizante

El suelo usado en este estudio fue colectado en ITESA (*Instituto Tecnológico Superior del Oriente del Estado de Hidalgo*) localizado en Apan, Estado de Hidalgo, México (4° 44' N, 74° 25' W). Se definieron tres parcelas de 400 m² y se muestreó en 20 puntos la capa de 0-20 cm del suelo. Las muestras de suelo fueron pasadas a través de un tamiz de 5 mm y posteriormente caracterizadas.

Se obtuvo una solución de biofertilizante orgánico de un cultivador local de la región de Hidalgo (México) que es utilizada en campo. El biofertilizante es fabricado artesanalmente por la mezcla de lixiviados de compost de estiércol de vaca, vermicompost y una fermentación líquida que contiene diferentes microorganismos. Una parte de la solución del biofertilizante fue almacenada a 4°C luego del muestreo, la otra parte fue esterilizada y posteriormente también refrigerada.

4.2 Características fisicoquímicas del suelo y Biofertilizante

En el suelo analizado es clasificado como Phaeozem (World Reference Soil, WRS), la textura obtenida fue arenosa franco arcillosa, en la Tabla 2 se muestran las principales características del suelo. Donde se puede apreciar un porcentaje de humedad bastante bajo, un pH con tendencia a lo neutro, una CRA de 515.21 g kg⁻¹ y una CE de 216.7 (dSm⁻¹). En el caso del biofertilizante (Tabla 3), se pueden observar las principales características fisicoquímicas del biofertilizante utilizado en el experimento.

Tabla 2. Caracterización Fisicoquímica inicial del suelo

Propiedad	<i>Media^a</i>
% Humedad	1.99
pH	6.62
CRA (g ×Kg-1)	515.21
CE (dSm-1)	2.16
Arena (%)	53.19
Arcilla (%)	23.50
Limo (%)	23.31
Amonio mg Kg-1 Ss	8.16
Nitrito mg Kg-1 Ss	0.01
Nitrato mg Kg-1 Ss	1.91

CE: Conductividad Eléctrica, CRA: Capacidad Retención de Agua, Ss: suelo seco

^a Media de tres parcelas (n = 3)

Las características del suelo fueron medidas antes de iniciar el experimento y en el muestreo final. El contenido de humedad en el suelo fue determinado por la pérdida de peso después que las muestras fueron secadas en un horno a 60°C por 48 h. La capacidad de retención de agua (CRA) fue determinada por la saturación de 50 g de suelo con agua destilada, se dejó drenar por 24 h y se midió la cantidad de agua retenida. La

conductividad eléctrica (CE) fue medida con un microprocesador HI 2300 (HANNA Instruments, Woonsocket, RI, USA). La distribución del tamaño de partículas se determinó con el método del hidrómetro descrito por Gee y Bauder (1986). El pH fue medido al mezclar 10 g de suelo con 25 mL de agua destilada con un potenciómetro calibrado (Denver Instrument, Bohemia, NY, USA) equipado con un electrodo de vidrio (3007281 pH / ATC Termofisher Scientific, Waltham, MA, USA).

El N mineral (NO_3^- , NO_2^- and NH_4^+) fue medido en el suelo y en el biofertilizante. Para el suelo se hicieron submuestras de 20 g con 80 mL de K_2SO_4 al 0.5 M y se filtró con papel Whatman®. Se determinó colorimétricamente con el Sistema automático analizador SKALAR (Breda, Netherlands) (Mulvaney 1996). Para el biofertilizante, se usaron 50 mL, se clarificó la muestra con una solución de hidróxido de aluminio (125 g en un litro) para remover la interferencia (Eatson et al. 2005) .

4.3. Experimento en Invernadero

El experimento se llevó a cabo en un invernadero del departamento de Biotecnología y Bioingeniería en el Cinvestav, situado al norte de ciudad de México. Durante el cultivo de maíz la temperatura promedio fue de 15°C y máximo de 35°C desde abril a septiembre de 2017. Se usó un diseño de bloques completamente aleatorizado que incluía seis tratamientos. Los tratamientos fueron, Sin cultivar 1) C: suelo control sin biofertilizante; 2) B: suelo con biofertilizante; 3) BE: suelo con biofertilizante esterilizado; Suelo cultivado (4) C: suelo sin biofertilizante con plantas de maíz; (5) B: suelo con biofertilizante con plantas de maíz y (6) BE: suelo con biofertilizante esterilizado con plantas de maíz. Dependiendo de la localización del suelo puede ser sin cultivar (sc), no rizosférico (nr) y rizósfera (r). Cada tratamiento fue replicado tres veces con tres subréplicas por parcela. Se usaron columnas plásticas de 17 cm de diámetro \times 60 cm de altura. Se pusieron 0.5 kg de tezontle y aproximadamente 10 kg de suelo de las tres parcelas muestreadas y tamizadas previamente en cada una de las columnas.

El diseño experimental se muestra en la Figura 2, en los tratamientos que incluían plantas (C, B y BE), se sembraron tres semillas en cada una de las columnas y luego de su germinación se dejó solo una planta por columna. Se usó la semilla certificada híbrida de maíz (*Zea mays L.*) variedad 215W Eagle, Híbridos Lobo de

origen Sinaloa, México. Las semillas venían previamente tratadas para evitar su contaminación. Mientras se esperaba la germinación se regó cada dos días cada columna con 500 mL de agua.

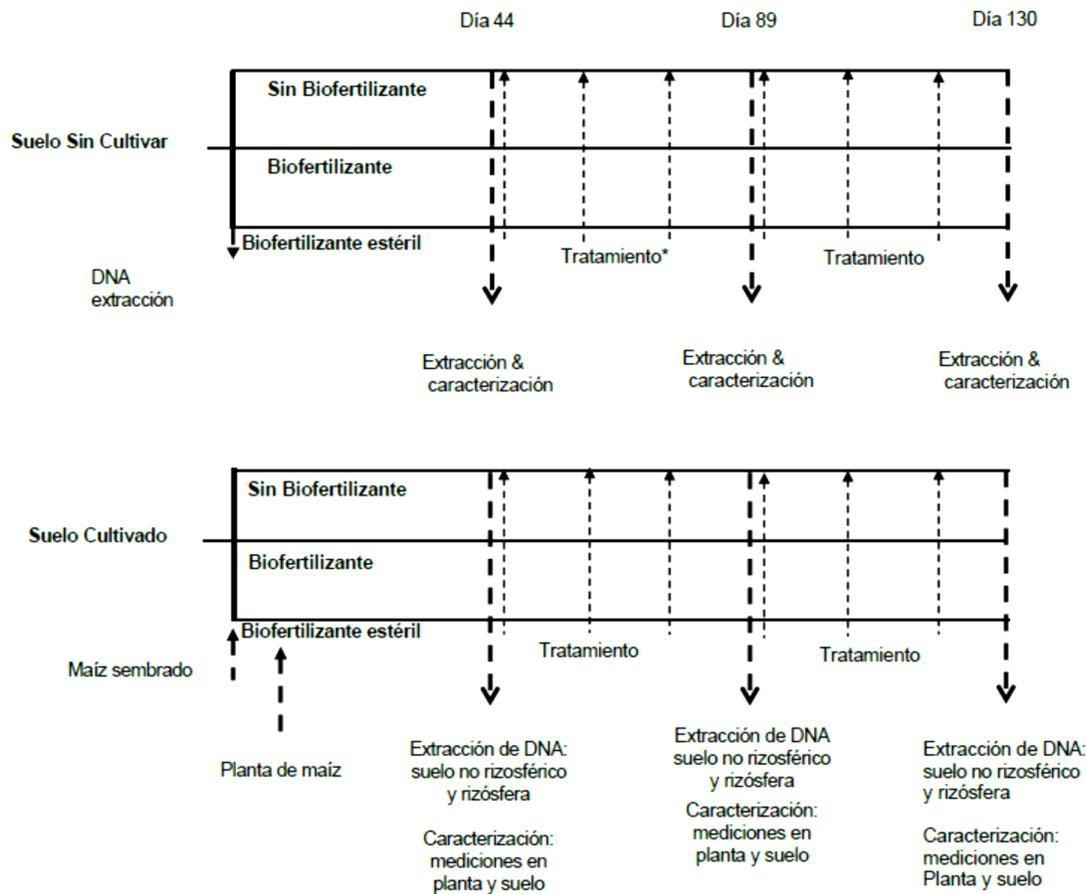


Figura 2. Diseño experimental en el invernadero y toma de muestras

Para los tratamientos que tenían aplicación de la solución de biofertilizante o biofertilizante estéril, en el tratamiento sin biofertilizante solo se agregó agua. La aplicación del biofertilizante se hizo con ayuda de un aspersor, en el suelo y la planta. Esto se realizó el día de la siembra de las semillas y los días 1, 44, 60, 90 y 120 (17/abril, 31/mayo, 5/junio, 19/julio, 2/agosto, 20/septiembre and 12/octubre de 2017). Se usó la dosis recomendada para el biofertilizante orgánico (80-100 L por hectárea), aproximadamente 20 mL para los tratamientos en cada aplicación.

Se hicieron tres muestreos en los días 44, 89 y 130 del cultivo. En cada muestreo se tomó una muestra de suelo de los primeros 15 cm de la columna, no adherido a la raíz (suelo no rizosférico). En las plantas se tomó

adicionalmente el suelo pegado a la raíz (suelo rizosférico); también se lavó la raíz con agua destilada para tomar muestra del rizoplaneo e incluirlo en la muestra del suelo rizosférico. En cada muestreo las plantas fueron cosechadas y se midieron diversas variables en la planta como el largo de la planta, largo de la raíz, peso fresco planta y peso fresco de la raíz. Luego, fueron secadas a 60°C por 48 h para obtener el peso seco de la planta y peso seco de la raíz.

4.4 Extracción de DNA del Biofertilizante y suelo

Se tomaron submuestras de 0.5 g de suelo y 5 mL de biofertilizante fueron centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos y se removió el sobrenadante. Las muestras fueron lavadas con 10 mL de pirofosfato de sodio 0.15 mol L⁻¹ para eliminar los ácidos húmicos y fúlvicos, y este proceso fue repetido hasta que el sobrenadante saliera limpio. El exceso de pirofosfato fue eliminado lavando con buffer de fosfatos 0.15 mol L⁻¹ a pH 8 y centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos (Ceja-Navarro et al. 2010). Se usaron tres métodos diferentes para extraer el DNA de las muestras de suelo y biofertilizante. Cada método fue usado para extraer tres veces 0.5 g de suelo (un total de 1.5 g) y posterior al método de extracción se hizo un pool de cada muestra. El primer método utilizado se basó en una de las técnicas descritas por Sambrook and Russell (2001). Brevemente, el sedimento se resuspendió en 750 µL de solución de buffer de lisozima y 80 µL de lisozima concentración y se incubó a 37°C durante 1 h, posteriormente se agregaron 750 µL de SDS concentración. En el segundo método las células fueron lisadas usando dos soluciones de lisis y un choque térmico como lo describió Valenzuela-Encinas et al. (2008). El tercer método consistió en una solución detergente para realizar la lisis celular, seguido de una ruptura mecánica (Hoffman and Winston 1987).

4.5. Amplificación por PCR de los marcadores 16S rRNA (V3-V4)

A partir del DNA extraído se amplificaron las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA bacteriano usando los primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805R (5'-ACHVGGGTATCTAATCC-3' (Herlemann et al. 2011). Las condiciones de la PCR fueron 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 60 s en 94°C, 45 s en 53°C para 16S o 50°C para ITS, y 60 s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Después de la amplificación de PCR los productos fueron limpiados usando el kit FastGen Gel/PCR (Nippon Genetics Duren, Germany) y se cuantificó la cantidad de DNA usando el fluorospectrómetro Nanodrop 3300 (ThermoFisher, Wilmington, DE,

USA) con PicoGreen dsDNA. Las muestras fueron mezcladas en cantidades equimolares y secuenciadas usando la tecnología de secuenciación Illumina Miseq en MacroGen Inc. (Seoul, Korea).

4.6. Análisis de datos de las secuencias 16S rDNA

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el Programa Qiime versión 1.91 (Caporaso, Kuczynski, and et al 2010). Las secuencias barcode fueron removidas del resto de las secuencias, usando el script `extract_barcode.py`. Las secuencias quiméricas fueron identificadas usando `identify_chimeric_seqs.py` con el método `usearch61` (Edgar 2010) y fueron eliminadas. Estas secuencias fueron agrupadas como unidades operacionales taxonómicas, conocidas como OTU (Operational taxonomic units) con un nivel de similaridad del 97% usando el algoritmo UCLUST (Edgar 2010). Luego, fueron alineadas contra la base de datos de referencia de Greengenes (DeSantis et al. 2006) usando la versión 1.2.2 de PyNAST (Caporaso et al. 2010). El conjunto de datos obtenido fue filtrado y descartadas todas aquellas OTUs asignadas como Archaea. Después, el conjunto de datos fue normalizado a través de la transformación de OTU a abundancia relativa. Las curvas de rarefacción así como los índices de diversidad alfa (chao 1, shannon, simpson and simpson-e) fueron también analizados en el programa Qiime. Para el cálculo de los índices de diversidad alfa, se usaron un total de 478,000 secuencias.

Adicionalmente las secuencias no identificadas y quimeras se removieron a partir de las secuencias usando el paquete Phyloseq en R (McMurdie and Holmes 2013). Finalmente, se obtuvieron las unidades taxonómicas operacionales (OTU), usando USEARCH (Edgar 2010) para agrupar las secuencias con mayor similitud que juntas formen un OTU. La clasificación taxonómica será asignada en un proyecto de base de datos ribosomales (RDP)(Q. Wang et al. 2007) clasificado contra Greengenes (DeSantis et al. 2006) con un rango de confianza de 0.8 en Qiime v2.0 (Caporaso, Kuczynski, and et al 2010) como base de datos de referencia. Los índices de diversidad y riqueza serán también analizados en Qiime. Las secuencias generadas en este estudio fueron sometidas a la base de datos NCBI SRA bajo el bioproject PRJNA565000.

4.7. Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en R Studio (R Core Team, 2016). Se utilizó una prueba no paramétrica para determinar el efecto de la aplicación del biofertilizante y el tiempo en las características de la planta y el suelo con la prueba de una vía no paramétrica del paquete WRS2 (una colección de métodos

estadísticos robustos) (Mair and Wilcox 2020). También para determinar el efecto de la aplicación del biofertilizante o el cultivo de maíz sobre la diversidad alfa bacteriana con la prueba t1way no paramétrica del paquete WRS2(Mair and Wilcox 2019). Los mapas de calor de las abundancias relativas de los grupos bacterianos se construyeron con el paquete Pheatmap en R (Kolde 2019). El análisis de componentes principales (PCA), la comparación multivariante (perMANOVA) y la abundancia diferencial (ALDEx2) se realizaron con datos de secuencia convertidos utilizando la prueba de transformación de relación logarítmica centrada devuelta por el argumento `aldex.clr` (paquete ALDEx2(Gloor et al. 2019)). El PCA se hizo con el paquete `vegan` (Oksanen et al. 2019). El efecto de la aplicación del biofertilizante y el cultivo de maíz sobre los grupos bacterianos se determinó utilizando un enfoque composicional, es decir, el análisis de la abundancia diferencial teniendo en cuenta la variación de la muestra (`aldex.kw` argumento, paquete ALDEx2). También se realizó un análisis multivariante de varianza por permutaciones (perMANOVA) con recuentos de secuencias convertidos utilizando la transformación de relación logarítmica centrada, es decir, el argumento `aldex.clr` (paquete ALDEx2 en R (Gloor et al. 2019). Las matrices de distancia por pares se calcularon utilizando la distancia de Aitchison se calcularon en las matrices de distancia con paquete `vegan` de R (Oksanen et al. 2019).

5. Resultados

5.1 Caracterización del biofertilizante, suelo y planta de maíz

El pH del biofertilizante fue ácido (4,3) con una conductividad electrolítica (CE) de 20,4 dS m⁻¹ y el contenido de NH₄⁺ fue de 864 mg kg⁻¹ (Tabla 3). En contraste, el contenido de NH₄⁺, NO₃⁻ y la conductividad eléctrica aumentaron ligeramente en el biofertilizante estéril. Por su parte, el pH fue de 4.4 y el contenido de NO₂⁻ fue menor 7.9 mg kg⁻¹ en el biofertilizante estéril (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización Fisicoquímica del Biofertilizante

Muestra	CE <i>(dSm-1)</i>	pH	Amonio <i>mg Kg-1</i>	Nitrato <i>mg Kg-1</i>	Nitrito <i>mg Kg-1</i>
Biofertilizante	20.4	4,3	864	13.5	9.0
Biofertilizante estéril	17,05	4,4	965,9	14,6	7,9

CE: Conductividad Eléctrica

La aplicación de biofertilizante o biofertilizante estéril no alteró el pH del suelo, pero el cultivo de maíz lo aumentó significativamente ($F = 20,27$, $P < 0,001$). La concentración de NH_4^+ y NO_2^- no se vio afectada significativamente por el cultivo de maíz o la aplicación del biofertilizante o el biofertilizante esterilizado. La concentración de NO_3^- se vio afectada de manera muy significativa por el cultivo de maíz ($F = 47,55$, $P < 0,001$), pero la aplicación de biofertilizante o biofertilizante esterilizado no tuvo ningún efecto sobre ella. La concentración de NO_3^- aumentó significativamente en el suelo no cultivado con el tiempo ($P < 0,05$), pero no en el suelo cultivado con maíz. Ninguna de las características del maíz se vio afectada significativamente por el tratamiento, pero la mayoría de estas aumentaron significativamente con el tiempo ($P < 0,001$) (Tabla 5).

Tabla 4. Dinámica de N mineral y pH en el suelo con y sin planta de maíz de aplicar los tratamientos C (sin biofertilizante), B (con biofertilizante), BE (con biofertilizante estéril) en los tres tiempos de muestreo (44, 89 y 130 días), concentración de nitrito NO_2^- , concentración de nitrato NO_3^- y concentración de amonio NH_4^+ (mg N kg^{-1} suelo).

Localización	Tratam	Día de muestreo					
		44			89		
		pH			NH_4^+ (mg kg^{-1})		
Sin cultivar	C	7.0 ^a ± 0.2 ^b	7.2 ± 0.3	6.9 ± 0.3	4.1 ± 0.2	5.3 ± 1.7	5.5 ± 0.5
	B	6.9 ± 0.2	7.0 ± 0.4	6.9 ± 0.1	4.3 ± 0.3	1.7 ± 0.3	3.4 ± 0.4
	BE	6.8 ± 0.3	6.5 ± 0.1	7.2 ± 0.2	5.4 ± 0.3	1.8 ± 1.7	3.8 ± 0.7
Cultivado con maíz	C	7.1 ± 0.1	7.6 ± 0.2	8.4 ± 0.1	5.6 ± 0.2	2.6 ± 0.5	3.9 ± 0.3
	B	7.0 ± 0.1	7.4 ± 0.4	7.9 ± 0.6	7.8 ± 2.4	0.7 ± 0.8	4.2 ± 0.2
	BE	6.7 ± 0.4	8.1 ± 0.3	8.2 ± 0.1	5.3 ± 0.3	1.6 ± 1.1	4.6 ± 1.3
		NO_2^- (mg kg^{-1})			NO_3^- (mg kg^{-1})		
Sin cultivar	C	0.11 ± 0.01	0.68 ± 0.24	0.13 ± 0.07	10.2 ± 2.7	27.3 ± 8.1	35.8 ± 6.6
	B	0.11 ± 0.08	0.25 ± 0.05	0.19 ± 0.02	8.4 ± 1.1	20.5 ± 3.3	20.4 ± 4.8
	BE	0.10 ± 0.07	0.23 ± 0.05	0.15 ± 0.01	6.7 ± 0.9	34.6 ± 6.8	22.6 ± 4.1
Cultivado con maíz	C	0.02 ± 0.00	0.25 ± 0.03	0.15 ± 0.03	1.3 ± 1.1	2.7 ± 1.6	2.4 ± 0.3
	B	0.08 ± 0.04	0.31 ± 0.08	0.18 ± 0.02	0.8 ± 0.8	3.3 ± 1.0	3.3 ± 0.8
	BE	0.12 ± 0.06	0.20 ± 0.06	0.07 ± 0.07	0.7 ± 0.9	3.1 ± 0.9	3.5 ± 0.8

^a Medía de tres muestras, ^b la desviación estándar de las tres muestras

Tabla 5. Características de las plantas de maíz (*Zea mays* L.) en suelos sin biofertilizante, con biofertilizante o biofertilizante estéril después de 44, 89 y 130 días.

Tratamiento	Longitud raíz (cm)					Altura de planta (cm)				
	Días de muestreo			Valor F	Valor p	Días de muestreo			Valor F	Valor p
	44	89	130			44	89	130		
Sin Biofertilizante	27.7 ^a A ^b b ^c	78.0 A a	82.9 A a	81.56	< 0.001	48.6 A c	99.1 A b	140.7 A a	133.39	< 0.001
Biofertilizante	24.1 A b	79.0 A a	80.2 A a	36.97	0.003	38.2 A c	100.8 A b	136.9 A a	74.54	< 0.001
Biofertilizante estéril	46.5 A b	85.6 A a	94.2 A a	15.10	0.015	52.2 A c	98.1 A b	149.7 A a	340.96	< 0.001
Valor F	4.95	0.76	0.58			1.78	0.06	4.43		
Valor p	0.094	0.528	0.603			0.285	0.943	0.130		
	Peso fresco de la raíz (g)					Peso seco de la raíz (g)				
Sin Biofertilizante	3.7 A b	32.1 A a	30.6 A a	386.61	< 0.001	1.9 A c	6.2 A b	30.9 A a	30.67	0.014
Biofertilizante	2.2 A a	37.3 A a	37.6 A a	19.84	0.050	1.8 A b	7.0 A b	29.1 A a	143.23	0.002
Biofertilizante estéril	7.6 A b	51.2 A a	31.8 A a	24.84	0.008	2.8 A b	10.2 A b	34.6 A a	31.08	0.011
Valor F	2.90	0.88	0.50			1.16	1.20	0.80		
Valor p	0.185	0.489	0.654			0.409	0.406	0.521		
	Peso fresco de la planta (g)					Peso seco de la planta (g)				
Sin Biofertilizante	15.7 A b	139.5 A a	145.1 A a	213.42	< 0.001	3.8 A c	7.8 A b	23.2 A a	60.68	0.002
Biofertilizante	10.7 A b	131.4 A a	148.5 A a	223.41	< 0.001	3.0 A c	9.4 A b	27.2 A a	1656.65	< 0.001
Biofertilizante estéril	32.6 A b	142.5 A a	142.5 A a	34.36	0.004	4.4 A a	8.8 A a	25.4 A a	7.56	0.054
Valor F	2.50	0.15	1.70			2.76	0.87	1.54		
Valor p	0.214	0.864	0.851			0.186	0.498	0.356		

^a Media de tres muestras, ^b Valores con la misma letra mayúscula no es significativamente diferente entre los tratamientos i.e. entre las columnas, ^c valores con la misma letra no son significativamente diferentes sobre el tiempo. Prueba no paramétrica de una vía con el paquete WRS2, (Mair and Wilcox 2019).

5.2 Características del biofertilizante y su estructura de la comunidad bacteriana

Un total de 21,282 secuencias fueron obtenidas a partir de las muestras del biofertilizante que está representada en 533 OTUs. En el biofertilizante, los OTUs detectados fueron clasificados en 21 phyla y 91 géneros bacterianos (Fig. 3). La estructura de la comunidad bacteriana fue dominada por Firmicutes (abundancia relativa 91.33 ±4.99%), género *Lactobacillus* (11.90 ±12.40%) (Fig.4).

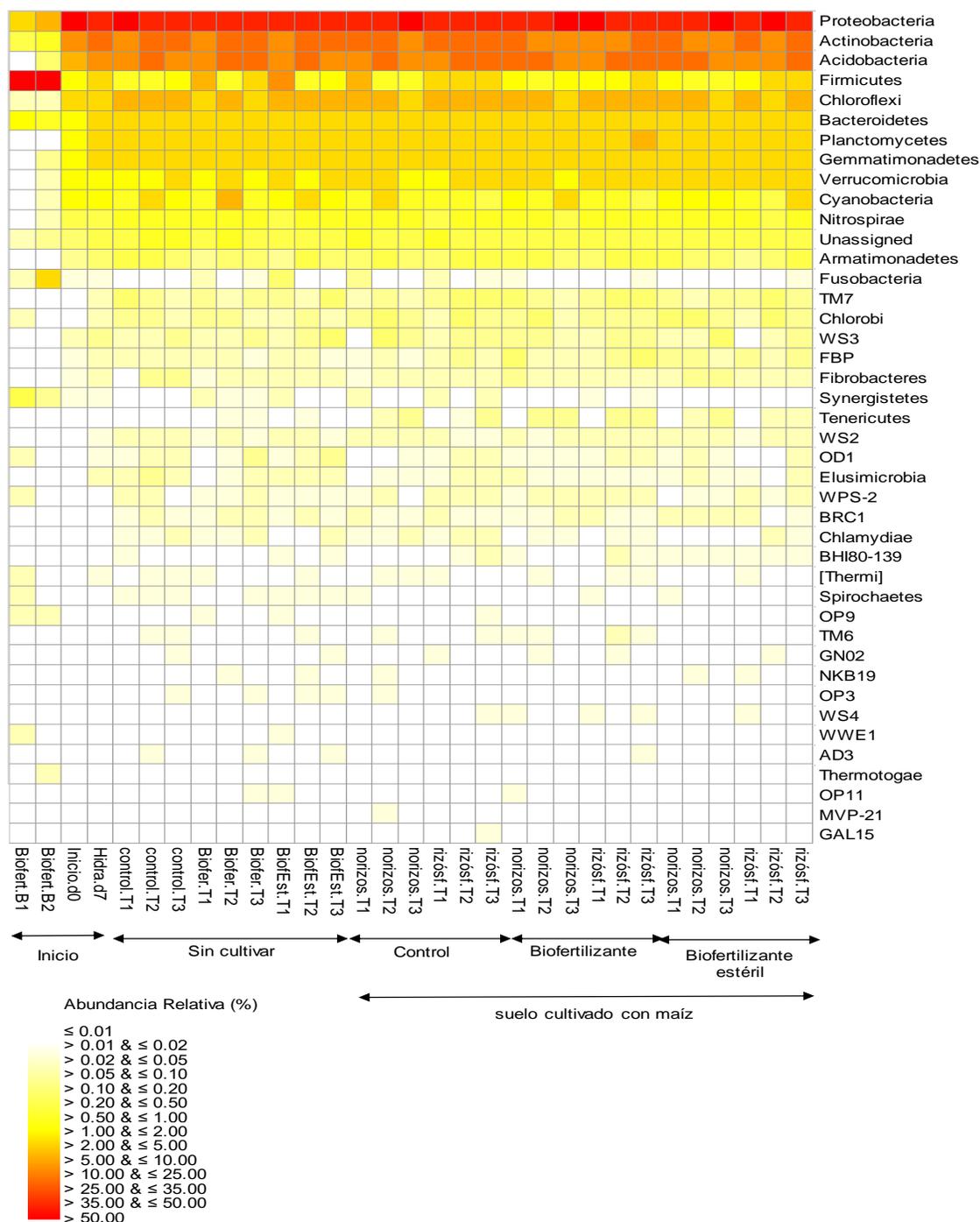


Figura 3. Mapa de calor los principales phyla cada tratamiento (control sin biofertilizante, con

biofertilizante y con biofertilizante estéril) y localización en el suelo (sin cultivar y cultivado: no rizosférico y rizósfera) en los tiempos de muestreo (T1= 44 días, T2= 89 días y T3 =130 días)

5.3 Curvas de Rarefacción y diversidad alfa

Un total de 2,570,199 secuencias del gen 16S rRNA fueron analizadas, las cuales están representadas en 36,686 OTUs. La curva de rarefacción del número de secuencias versus el número de OTUs fue asintótica (Fig. 5), por lo cual el análisis de más secuencias produciría solo un número limitado de nuevas OTU.

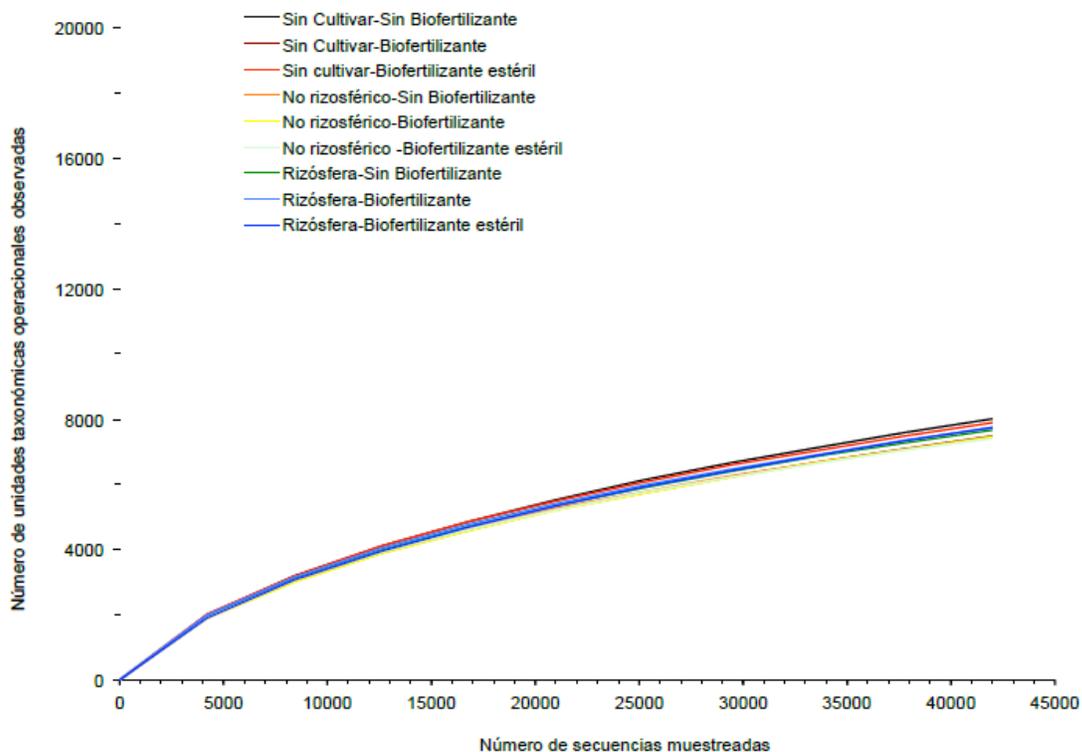


Figura 5. Curvas de rarefacción en los tratamientos en el número de OTUS

La aplicación del biofertilizante no tuvo un efecto significativo sobre los índices de diversidad alfa después de 89 o 130 días (Tablas 6 y 7). El cultivo de plantas de maíz tuvo principalmente un efecto muy significativo en los índices de diversidad alfa después de 44 y 130 días, pero no después de 89 días.

Tabla 6. Valores de diversidad Alfa en el suelo sin cultivar, no rizosférico y en la rizósfera de las plantas de maíz (*Zea mays L.*) en los tratamientos sin biofertilizante (C), con biofertilizante (B) y con biofertilizante estéril (BE) después de 89 y 30 días.

Suelo	Tratamiento	Día	Chao1	Shannon	Simpson
Sin cultivar	C	89	3440±15	9.62 ±0.02	0.997 ±0.000
		130	3078 ±374	8.88 ±0.72	0.981 ±0.018
	B	89	3054 ±178	9.40 ±0.27	0.995 ±0.003
		130	3030 ±94	8.61 ±0.40	0.977 ±0.009
	BE	89	3205 ±160	9.43 ±0.14	0.993 ±0.004
		130	3072 ±227	8.71 ±0.78	0.979 ±0.017
No rizosférico	C	89	3171 ±44	9.56 ±0.12	0.997 ±0.001
		130	2576 ±209	8.29 ±0.21	0.974 ±0.004
	B	89	3218 ±278	9.02 ±0.26	0.986 ±0.007
		130	2564 ±176	7.82 ±0.19	0.962 ±0.002
	BE	89	3170 ±40	8.76 ±0.36	0.979 ±0.008
		130	2739 ±158	8.41 ±0.09	0.977 ±0.004
Rizósfera	C	89	3286 ±194	9.40 ±0.16	0.995 ±0.002
		130	3155 ±19	9.06 ±0.51	0.991 ±0.006
	B	89	3440 ±232	9.35 ±0.18	0.993 ±0.004
		130	3342 ±205	9.42 ±0.33	0.996 ±0.003
	BE	89	3262 ±130	7.97 ±0.41	0.951 ±0.018
		130	3177 ±288	9.16 ±0.23	0.990 ±0.007

^a Media de tres mediciones ($n = 3$), ^b ± desviación estándar de la media.

Tabla 7. Índices de diversidad alfa y el efecto del tratamiento (C, B, o BE) y cultivo de planta (sc, nr y riz) en el suelo de plantas de maíz (*Zea mays L.*)

Factor	Día	Chao1		Shannon		Simpson	
		valor F ^a	valor P	valor F	valor P	valor F	valor P
Tratamiento	44	1.44	0.276	1.07	0.376	2.15	0.168
	89	0.68	0.525	7.61	0.050	7.56	0.050
	130	0.06	0.945	0.07	0.930	0.19	0.826
Cultivo de Planta	44	5.12	0.025	35.67	< 0.001	16.72	< 0.001
	89	2.47	0.142	4.04	0.054	2.91	0.108
	130	22.59	< 0.001	17.01	< 0.001	15.89	< 0.001

^a se usó una prueba no paramétrica, i.e. prueba de una vía t1 con el paquete WRS2 (Mair and Wilcox, 2017).

5.4 Efecto de la aplicación del biofertilizante o biofertilizante estéril sobre la comunidad bacteriana

La estructura de la comunidad microbiana en el suelo inicial se encuentra principalmente dominada por Proteobacteria ($47.68 \pm 4.30\%$) and Actinobacteria ($20.63 \pm 1.33\%$) (Fig. 4), principalmente miembros de *Kaistobacter* ($4.56 \pm 1.26\%$) y *Sphingomonas* ($2.43 \pm 1.06\%$) (Fig 5) dominaron los géneros bacterianos. Después de 130 días del experimento, los mayores incrementos en la abundancia relativa fueron en el suelo sin cultivar y sin biofertilizante, fueron para los miembros de *Acinetobacter*, *Halomonas*, *Nitrospirae*, *OD1* y *WS2*. Las mayores disminuciones se encontraron en *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Phormidium*, *Sphingomonas* y *TM7*. El enriquecimiento de los miembros de *Halomonas* ($11,18 \pm 6,52\%$) en el suelo sin cultivar y sin enmendar era tal que se convirtió en el género bacteriano dominante después de 130 días.

La aplicación de biofertilizante o biofertilizante estéril tuvo un pequeño efecto sobre la mayoría de los grupos bacterianos o OTUs, aunque un número limitado se vio fuertemente afectado, por ejemplo, *Delftia*, *Halomonas*, *Lactobacillus* y *Stenotrophomonas* (Fig. 6, Tablas 10 y 11).

Después de 130 días el PCA considerando los phyla bacterianos y los 50 géneros más abundantes, se ve una separación de las diferentes localizaciones del suelo (sin cultivar, no rizosférico y rizósfera), pero no se aprecia una distinción entre los tratamientos (control, biofertilizante y biofertilizante estéril) (Figs. 7 y 8). Miembros de Proteobacteria y BRC fueron enriquecidos en el suelo no rizosférico, Gemmatimonadetes y Planctomycetes en el suelo sin cultivar, mientras que Firmicutes y Verrucomicrobia en la rizósfera. En el suelo no rizosférico y sin cultivar, fueron enriquecidos miembros de *Halomonas* y *Pseudomonas*, mientras que *Acinetobacter* solamente en el suelo sin cultivar, y *Skermanella*, *Actinoplanes*, *DA101* y *Candidatus Solibacter* en la rizósfera (Fig. 8).

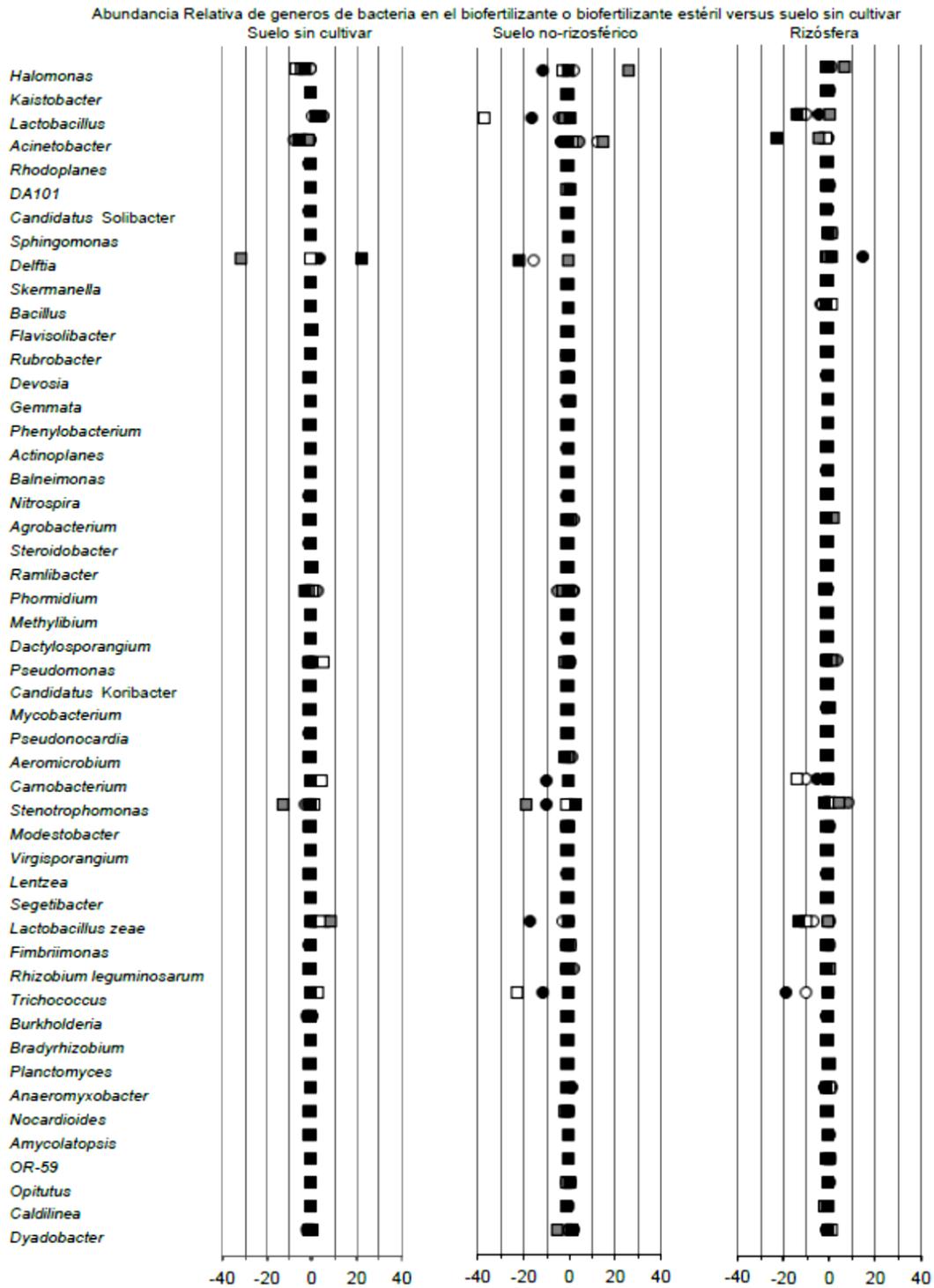


Figura 6. Razón de cambio de la abundancia relativa de los 50 géneros bacterianos más representativos en el suelo tratado con biofertilizante después de 44 días (□), 89 días (□) y 130 días (□) o biofertilizante estéril después de 44 días (○), 89 días (●) y 130 días (●) o biofertilizante

estéril después de 44 días (□), 89 días (■) y 130 días (■) versus el suelo sin biofertilizante (a) suelo sin cultivar, (b) suelo no rizosférico y (c) rizósfera.

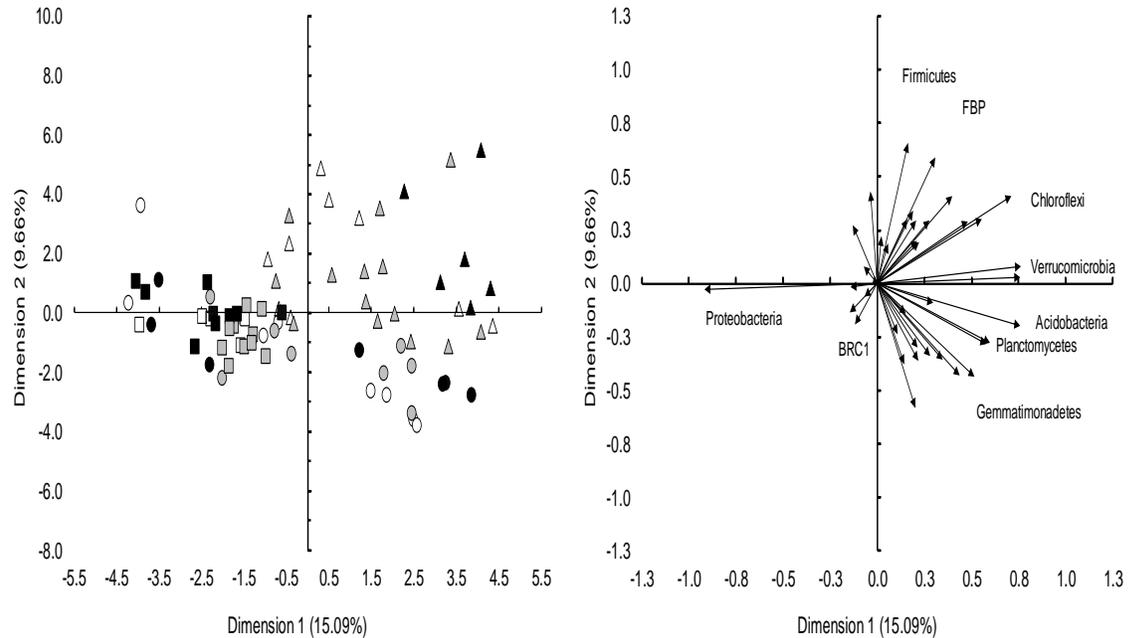


Figura 7. Análisis de componentes principales en el día 130 para los phyla de bacterias identificadas en el gen 16S rRNA para los tratamientos Control sin biofertilizante (C) (blanco), Biofertilizante (B) (negro) y Biofertilizante Estéril (BE) (gris), y según la localización en el suelo muestreado: □ Suelo no rizosférico (nr), ○ Suelo sin cultivar (s), Δ Suelo rizosférico (r).

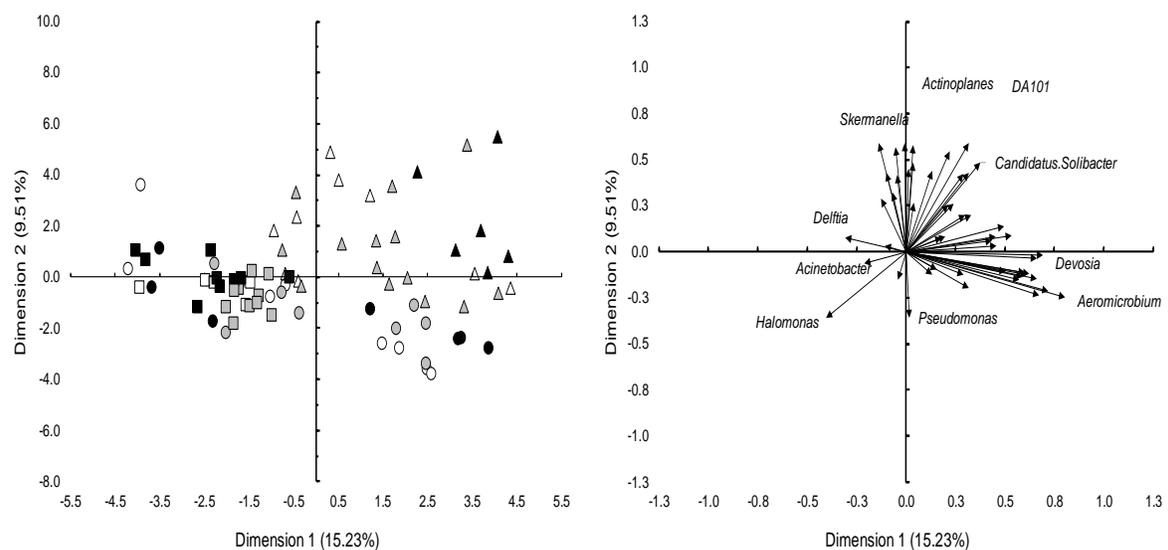


Figura 8. Análisis de componentes principales en el día 130 para los 50 primeros géneros de bacterias identificadas en el gen 16S rRNA para los tratamientos: Control sin biofertilizante (C) (blanco), Biofertilizante (B) (negro) y Biofertilizante estéril (BE) (gris), y según la localización en el suelo muestreado: □ Suelo no rizosférico (nr), ○ Suelo sin cultivar (s), Δ Suelo rizosférico (r).

El análisis del efecto del tamaño (LEfSe), se realizó filtrando los principales 50 géneros del Biofertilizante se encontraron pocos cambios en el suelo después de una sola aplicación del biofertilizante en el día 44 (Fig. 9 a). En el tratamiento control sin Biofertilizante para las localizaciones sin cultivar y suelo no rizosférico, se diferenciaron los géneros *Modestobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus* y *Halomonas*, relacionados a los biomarcadores del suelo inicial. Mientras que en el tratamiento con el biofertilizante fueron diferenciados otros géneros no relacionados a los biomarcadores del suelo inicial o el biofertilizante. En el suelo no rizosférico se diferencian con los géneros relacionados al suelo inicial *Geodermatophilus*, *Actinoplanes* y *Pseudomonas*, y la rizósfera fue muy distinguida con otros géneros como *Paracoccus* y *Acinetobacter*.

En el día 89 (Fig. 9 b) para el tratamiento sin Biofertilizante en todas las localizaciones del suelo se identificaron biomarcadores presentes en el suelo inicial (*Modestobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Actinoplanes* y *Sphingomonas*). Pero, en el tratamiento con Biofertilizante fue identificada *Halomonas* en el suelo inicial y en la rizósfera otro género *Acinetobacter*, presente en el biofertilizante; y finalmente, en el suelo sin cultivar fue identificado *Bacillus* un biomarcador del suelo inicial, y otro género *Clostridium* presente en el biofertilizante.

En el último muestreo en el día 130 (Fig. 9 c). en el tratamiento sin Biofertilizante para el suelo no rizosférico y la rizósfera fueron identificados los mismos géneros biomarcadores del suelo inicial (*Geodermatophilus*, *Modestobacter*, *Actinoplanes* y *Bacillus*) y en la rizósfera fue encontrado *Lactobacillus*. Mientras que en el tratamiento con biofertilizante fue identificado el género *Sphingomonas* biomarcador del suelo inicial.

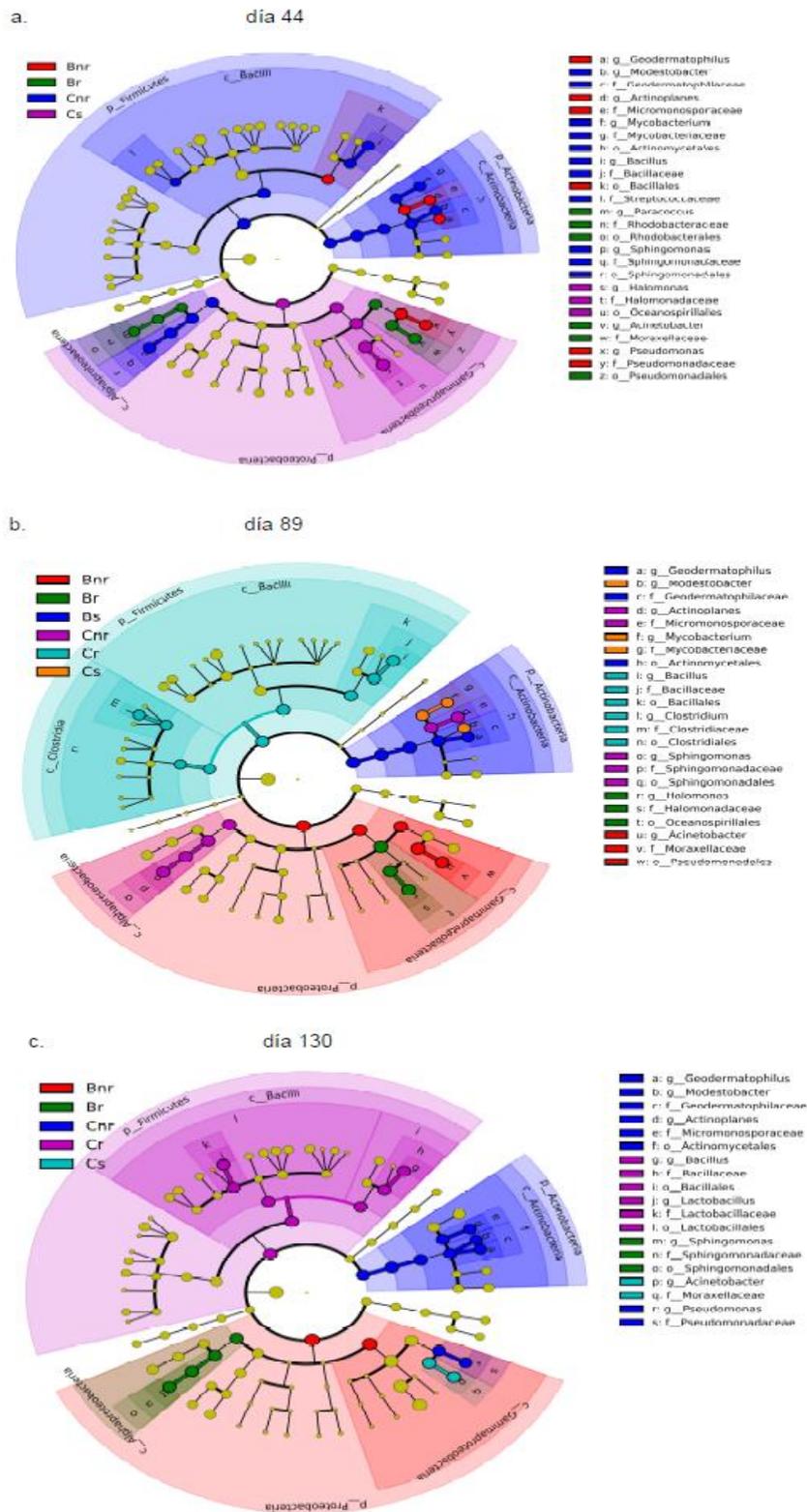


Figura 9. Cladograma a partir del análisis de LefSe para los principales 50 géneros presentes en el biofertilizante que ilustran la variación de los diferentes grupos taxonómicos presentes en la

comunidad bacteriana del suelo tratado con Biofertilizante (B) y el suelo control sin biofertilizante (C) en las diferentes localizaciones del suelo como s (sin cultivar), nr (no rizosférico), r (rizósfera), para los tres días de muestreo a los 44 días (a), 89 días (b), y 130 días (c). Las diferencias de color están representadas por el tratamiento y localización de suelo.

El PCA (Fig 10) mostró poco efecto de aplicación del biofertilizante sobre la comunidad bacteriana independiente del nivel taxonómico considerado, pero se visualizaron cambios en la composición de la estructura de la comunidad bacteriana (Tabla 10), en el suelo no cultivado a lo largo del tiempo más acentuados al considerar todos los grupos bacterianos asignados al nivel de género. En consecuencia, el análisis perMANOVA (Tabla 8) indicó que la aplicación del biofertilizante no tuvo un efecto significativo sobre la estructura de la comunidad bacteriana, pero el tiempo tuvo un efecto altamente significativo considerando los filos y géneros bacterianos ($P \leq 0,002$).

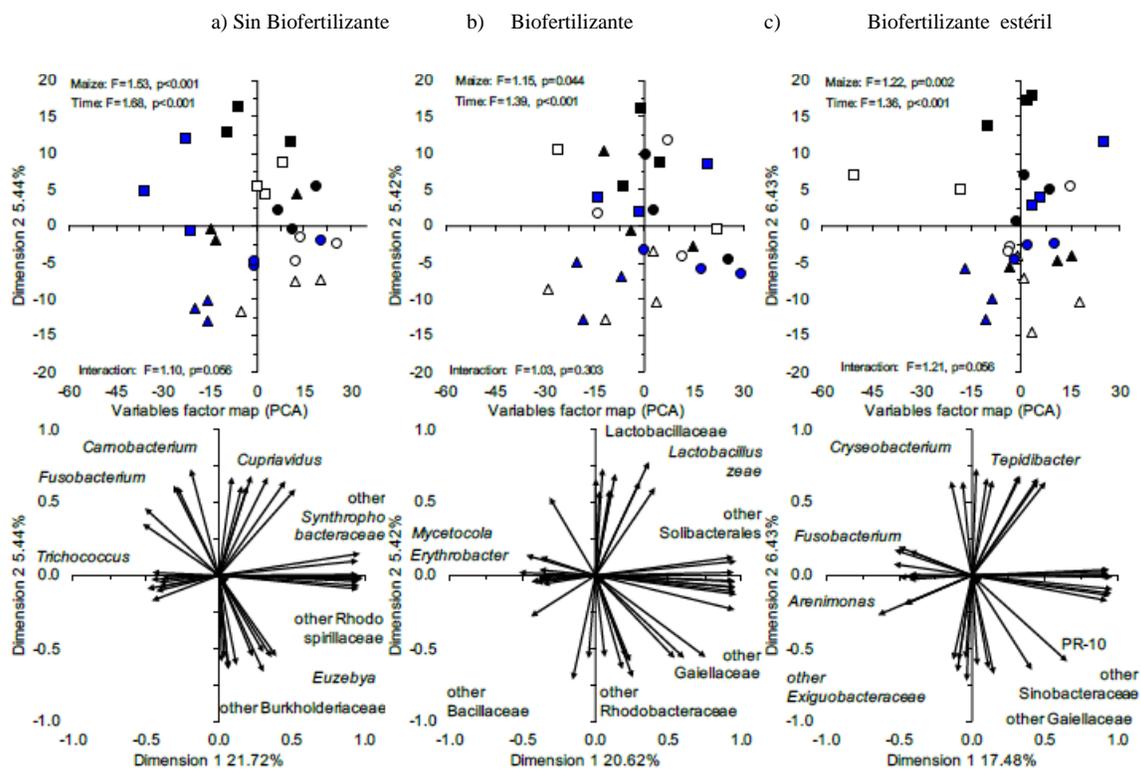


Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) con las phyla de bacteria en el suelo a) sin biofertilizante, b) biofertilizante y c) biofertilizante estéril con el suelo sin cultivar en el día 44 (□), día 89 (○) y día 130 (△), en el suelo no rizosférico en el día 44 (■), día 89 (●) y día 130 (▲), y en la rizósfera en el día 44 (■), día 89 (●) y día 130 (▲).

5.5 Efecto del cultivo de maíz sobre la estructura de la comunidad microbiana

El cultivo de maíz ha tenido un fuerte efecto sobre la comunidad bacteriana en suelo si biofertilizante, biofertilizante o biofertilizante estéril (Fig. 11). Los cambios en la abundancia relativa de la mayoría de los grupos bacterianos se encontraron en el suelo no rizosférico o en la rizósfera comparado con el suelo sin cultivar, los cuales fueron diferentes entre los tratamientos del suelo.

Abundancia relativa de géneros de bacterias en la rizósfera o en el suelo no rizosférico versus el suelo sin cultivar

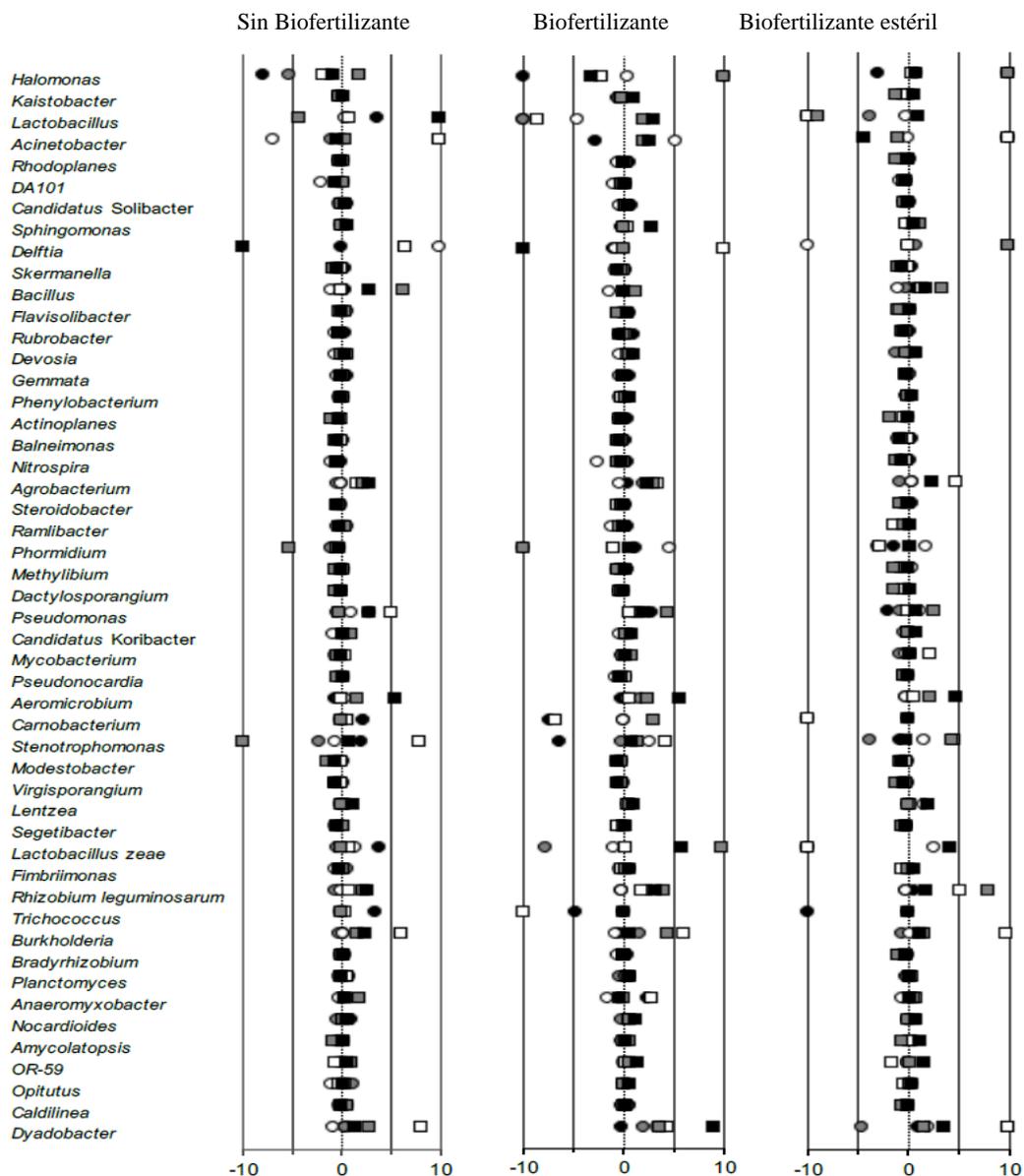


Figura 11. Razón de cambio en la abundancia relativa de los 50 géneros bacterianos en los tratamientos (a) sin biofertilizante, (b) biofertilizante y (c) biofertilizante estéril. En el suelo no

rizosférico después de 44 días (○), 89 días (●) y 130 días (●) o rizósfera después de 44 días (□), 89 días (■) y 130 días (■) versus el suelo sin cultivar

5.6 Efecto combinado de la aplicación del biofertilizante y el cultivo de maíz sobre la estructura de la comunidad bacteriana

El análisis de componentes principales PCA separaron la comunidad bacteriana en la rizósfera del suelo no cultivado, mientras que la aplicación de biofertilizante o biofertilizante estéril no separó las comunidades bacterianas después de 89 o 130 días (Fig.12, Tabla 9). El análisis de perMANOVA mostró que el cultivo de maíz (suelo no cultivado, no rizosférico y rizósfera) siempre tuvo un efecto significativo mayor en la estructura bacteriana de la comunidad que los tratamientos (suelo sin biofertilizante o suelo con biofertilizante o biofertilizante estéril). El efecto del cultivo de maíz también fue más significativo en el orden de $89 < 130$ días, como lo indican los valores F y P (Tabla 8).

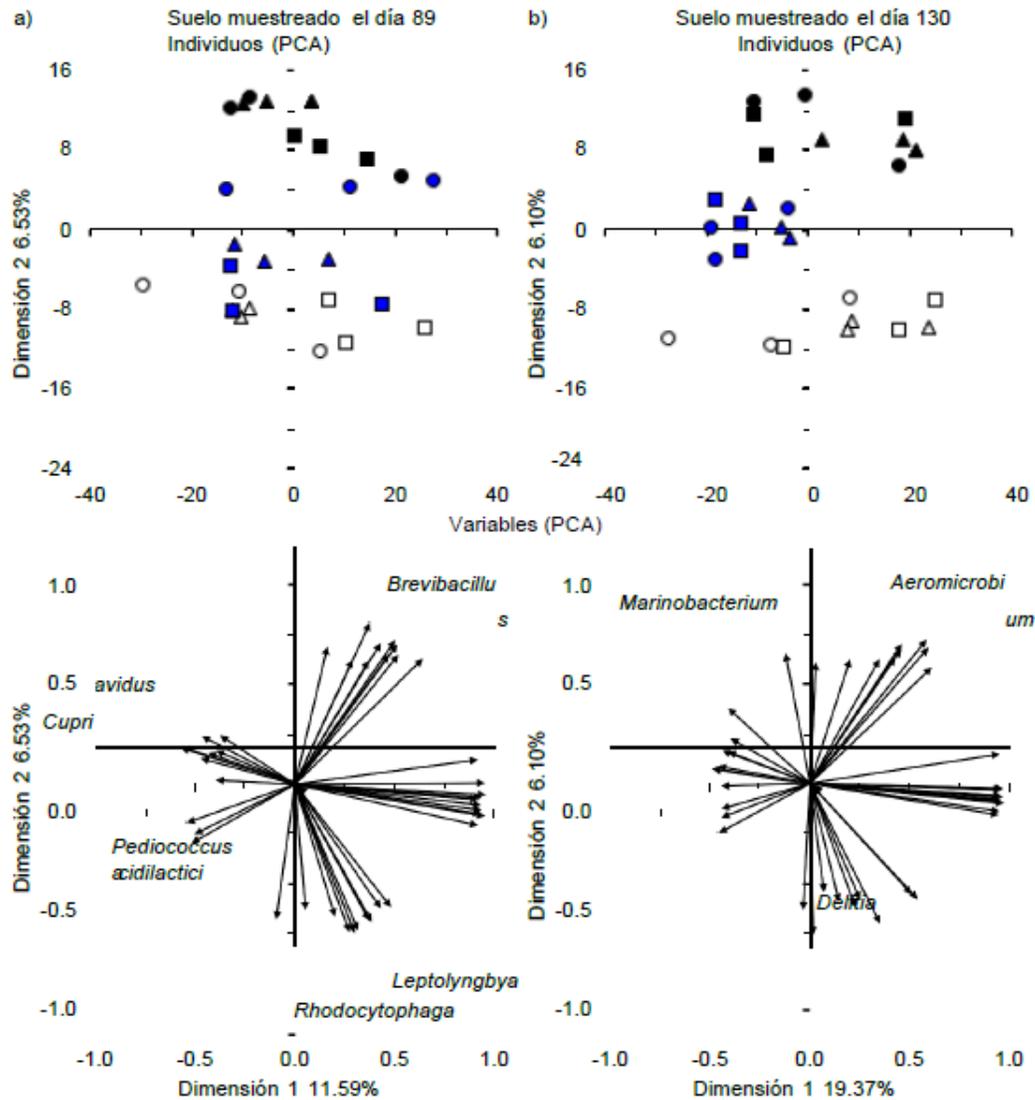


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) con todos los grupos bacterianos asignados para el nivel de género después de (a) 89 días y (b) 130 días en el suelo sin biofertilizante (□), suelo no cultivado con biofertilizante (○) y suelo no cultivado enmendado con biofertilizante estéril (△), suelo no rizosférico con biofertilizante (■) suelo no rizosférico con biofertilizante (●) y suelo no rizosférico con biofertilizante estéril (▲) y suelo de rizósfera sin biofertilizante (■), suelo de rizósfera con biofertilizante (●) y suelo de rizósfera con biofertilizante estéril (▲)

Tabla 8. Análisis de perMANOVA sobre el efecto del cultivo de maíz (Sin cultivar, no rizosférico o rizósfera), Tiempo (día 89 y 130) y su interacción, la aplicación del biofertilizante (Sin Biofertilizante, Biofertilizante o Biofertilizante estéril), Tiempo y su interacción, aplicación del biofertilizante,

localización y su interacción sobre la estructura de la comunidad bacteriana considerando los phyla y todos los géneros asignados

	Sin cultivar		No rizosférico		Rizósfera	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Biofertilizante	1.21	0.183	1.4	0.075	0.468	0.468
Tiempo	1.99	0.002	2.54	< 0.001	2.13	< 0.001
Biofertilizante*Tiempo	0.9	0.724	1.38	0.038	0.98	0.516

	Sin Biofertilizante		Biofertilizante		Biofertilizante estéril	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Cultivo de maíz	2.13	0.002	1.11	0.3	1.48	0.033
Tiempo	2.44	< 0.001	1.65	0.008	1.63	0.021
Cultivo*Tiempo	1	0.477	0.91	0.652	1.08	0.272

	Día 89		Día 130	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Biofertilizante	0.79	0.829	1.04	0.413
Maize cultivation	1.71	< 0.001	3.02	< 0.001
Cultivo*Biofertilizante	1	0.496	1.06	0.332

	Sin cultivar		No rizosférico		Rizósfera	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Biofertilizante	1.12	0.099	1.09	0.143	1.08	0.069
Tiempo	1.7	< 0.001	1.72	< 0.001	1.41	< 0.001
Biofertilizante*Tiempo	1	0.489	1.08	0.11	1.02	0.314

	Sin Biofertilizante		Biofertilizante		Biofertilizante estéril	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Cultivo de Maíz	1.53	< 0.001	1.15	0.044	1.22	0.002
Tiempo	1.68	< 0.001	1.39	< 0.001	1.36	< 0.001
Cultivo*Tiempo	1.1	0.056	1.03	0.303	1.21	0.056

	Día 89		Día 130	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Biofertilizante	1.04	0.23	1.09	0.121
Cultivo de Maíz	1.35	< 0.001	1.68	< 0.001
Cultivo*Biofertilizante	1.05	0.136	1.04	0.222

Tabla 9. Efecto de la aplicación del biofertilizante (C, B, BE) sobre los grupos bacterianos en el suelo no rizosférico y la rizósfera usando un acercamiento composicional, usando un análisis de abundancia diferencial y teniendo en cuenta la variación de muestras (paquete ALDEx2, Gloor et al., 2019).

Tratamiento	Día 44	Día 89	Día 130
Sin Cultivar		<i>Stenotrophomonas</i> (0.042) ^a	<i>Delftia</i> (0.029), <i>Ochrobactrum</i> (0.043)
No rizosférico	Firmicutes (0.047), <i>Lactobacillus zeae</i> (0.047)	<i>Acinetobacter</i> (0.028)	
Rizósfera		<i>Sphingomonas</i> (0.044)	
Sin Cultivar	<i>Agrobacterium</i> (0.049), <i>Devosia</i> (0.030), <i>Kaistobacter</i> (0.049)	<i>Halomonas</i> (0.027), <i>Paenibacillus</i> (0.047), <i>Stenotrophomonas</i> (0.042)	Cyanobacteria (0.048), Firmicutes (0.047), Tenericutes (0.046), <i>Aeromicrobium</i> (0.042), <i>Asteroleplasma</i> (0.039), <i>Delftia</i> (0.027), <i>Halomonas</i> (0.029), <i>Lactobacillus zeae</i> (0.047)
Biofertilizante	<i>Acinetobacter</i> (0.028), <i>Halomonas</i> (0.027), <i>Paracoccus marcusii</i> (0.049), <i>Phormidium</i> (0.041), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (0.049), <i>Stenotrophomonas</i> (0.042)	<i>Acinetobacter</i> (0.030), <i>Lactobacillus zeae</i> (0.042)	<i>Aeromicrobium</i> (0.042), <i>Halomonas</i> (0.034), <i>Luteolibacter</i> (0.037), <i>Skermanella</i> (0.049)
Biofertilizante estéril	<i>Acinetobacter</i> (0.028), <i>Phormidium</i> (0.041), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (0.049), <i>Tepidibacter</i> (0.037)	<i>Citromicrobium</i> (0.034), <i>Dyadobacter</i> (0.028), <i>Kaistobacter</i> (0.042), <i>Phormidium</i> (0.029), <i>Sphingomonas</i> (0.027)	Tenericutes (0.044), <i>Delftia</i> (0.027), other <i>Pseudomonas</i> (0.039), <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (0.047), <i>Vibrio metschnikovii</i> (0.029)

Tabla 10. Efecto de la aplicación del biofertilizante (C, B, BE) sobre los grupos bacterianos en el suelo sin cultivar, no rizosférico y rizósfera (sc, nr, riz) usando un análisis composicional (paquete ALDEx2, Gloor et al., 2019).

	Control (C)	Biofertilizante (B)	Biofertilizante estéril (BE)
Sin cultivar (sc)	<i>Citromicrobium</i> ^a (0.049 ^b), <i>Haliangium</i> (0.035), <i>Kaistobacter</i> (0.027), <i>Plesiocystis</i> (0.042)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (0.038), <i>Delftia</i> (0.038), <i>Kaistobacter</i> (0.041)	<i>Citrobacter</i> (0.042)
No rizosférico (nr)	Firmicutes (0.044) <i>Citrobacter</i> (0.042), <i>Halomonas</i> (0.039), <i>Lactobacillus zeae</i> (0.044), <i>Lactococcus</i> (0.047), <i>Pseudomonas</i> (0.047), <i>Vibrio metschnikovii</i> (0.049)	<i>Halomonas</i> (0.039), <i>Sorangium cellulosum</i> (0.039), <i>Virgisporangium</i> (0.035)	Tenericutes (0.046) <i>Asteroleplasma</i> (0.0048), <i>Devosia</i> (0.039), <i>Kaistobacter</i> (0.033), <i>Sphingomonas</i> (0.043), <i>Stenotrophomonas</i> (0.042)
Rizósfera (riz)	Bacteroidetes (0.044), Unassigned bacteria (0.037) <i>Aeromicrobium</i> (0.049), <i>Flavisolibacter</i> (0.046), <i>Geobacter</i> (0.049), <i>Halomonas</i> (0.046), <i>Kaistobacter</i> (0.027), <i>Paenibacillus</i> (0.036), <i>Pseudomonas</i> (0.045), <i>Stenotrophomonas</i> (0.034)		<i>Acinetobacter</i> (0.027), <i>Burkholderia</i> (0.043), <i>Chryseobacterium</i> (0.039), <i>Dyadobacter</i> (0.040), <i>Halomonas</i> (0.027), <i>Kaistobacter</i> (0.036), <i>Parvibaculum</i> (0.028), <i>Sorangium cellulosum</i> (0.035), <i>Stenotrophomonas</i> (0.035), <i>Virgisporangium</i> (0.042)

^a Todos los grupos bacterianos que fueron significativamente afectados por los factores son dados ($P < 0.05$), ^b valores entre paréntesis: valores esperados de la prueba de Kruskal-Wallis test para cada uno obtenido por el argumento aldex.kw convertido en secuencia de datos transformado usando log-ratio por el argumento de aldex.clr (ALDEx2 package).

6. Discusión

El biofertilizante se obtuvo de un agricultor local, ya que queríamos reproducir de la mejor manera posible las prácticas utilizadas en una de las zonas productoras de maíz de alto rendimiento en México, es decir, el Valle del Mezquital en Hidalgo. Además, algunas características químicas limitarán el uso regular del biofertilizante. Primero, la conductividad eléctrica (CE) era alta ya que el biofertilizante contiene lixiviados de compost, por la aplicación repetida durante diferentes ciclos de cultivo podría aumentar el contenido de sal del suelo, y en última instancia, inhibir el crecimiento de las plantas. En segundo lugar, el pH del primer biofertilizante era bajo, lo que podría acidificar el suelo, por lo que podría ser necesario un ajuste con cal, pero eso podría facilitar la volatilización del NH_3 . En tercer lugar, el alto contenido de NH_4^+ beneficiará el crecimiento del cultivo, pero la aplicación excesiva podría conducir a la oxidación a NO_3^- , acidificando aún más el suelo y lixiviación de NO_3^- y desnitrificación y producción de N_2O .

La estructura bacteriana de la comunidad en el biofertilizante fue dominada por diferentes Lactobacillales, por ejemplo, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Trichococcus*. Las bacterias del ácido láctico, asociadas con varios nichos de plantas y animales que incluyen géneros industrialmente importantes, son bacterias microaerófilas Gram-positivas que fermentan azúcares hexosa para producir principalmente ácido láctico (Makarova et al. 2006). *Lactobacillus* ha sido usado como inoculante para mejorar el crecimiento vegetal, conocido como microorganismo efectivo (Lamont et al. 2017; Limanska et al. 2013). También ha sido identificado por dominar en diferentes procesos de fermentación en el compostaje y como parte de biofertilizantes comerciales (Martins et al. 2013; Hanapi et al. 2013). En las bacterias acidolácticas se han encontrado una amplia gama de características promotoras del crecimiento de las plantas. Algunas de estas bacterias pueden aumentar la disponibilidad de nutrientes del compost y otros materiales orgánicos y son agentes de biocontrol de una amplia variedad de fitopatógenos fúngicos y bacterianos (Limanska et al. 2013). Pueden estimular el crecimiento de las plantas y se ha demostrado que producen ácido indol-3-acético (AIA) (Mohite 2013). Giassi et al. (2016) hallaron que estas bacterias pueden solubilizar el fosfato, y algunas cepas de bacterias ácido

lácticas de un fermento de caña de azúcar podían fijar nitrógeno atmosférico. Javaid (2011) aplicó un biofertilizante con este tipo de bacterias en un suelo modificado de estiércol de corral y mejoró el crecimiento de raíces y brotes en el arroz (*Oriza sativa* L.). Limanska et al. (2013) informaron que *Lactobacillus plantarum* aumentó la germinación, el brote y la longitud de la raíz de los tomates (*Lycopersicon esculentum*). Quattrini et al. (2018) utilizaron *L. plantarum* que exhibió como biocontrol de hongos y la germinación inducida de cereales y promovió el crecimiento de las plantas.

Sin embargo, un diseño experimental sin incluir un biofertilizante esterilizado hace imposible determinar si los microorganismos causaron el efecto o el sustrato. La esterilización del biofertilizante utilizado permitirá separar el efecto de los microorganismos en el desarrollo de la planta y el posible efecto del sustrato. Sin embargo, la esterilización de un biofertilizante aumentará su contenido de nutrientes de la planta indirectamente, ya que los microorganismos lisados, que en su mayoría son fácilmente degradados con una baja proporción de C a N, proporcionarán nutrientes al ecosistema estudiado tras la mineralización. En el presente estudio la longitud de la raíz del maíz aumentó solo cuando se aplicó biofertilizante estéril al suelo en comparación con las plantas control y las que se aplicaron inicialmente con biofertilizante.

El suelo sin cultivar tiene mayor contenido de NO_3^- , que el suelo cultivado con maíz y las concentraciones tienden a incrementar con el tiempo. Raiesi, (2006), evaluó el impacto combinado del suelo cultivado y los residuos del cultivo en la mineralización del N. Este estudio, confirmó que el cultivo disminuyó el contenido de N e incrementó significativamente la mineralización del N. En nuestros resultados, el amonio disminuyó y la conversión a nitrato por la nitrificación es baja. La disponibilidad de N para las plantas de cultivo es organizada por la conformación de materiales orgánicos y las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo (Robertson and Groffman 2015).

El biofertilizante usado en este estudio es producido a partir de composta de heces de vaca y vermicomposta. El suelo tratado con el biofertilizante y el biofertilizante esterilizado mostraron una reducción en la cantidad de nitrato comparado con el tratamiento control. Una posible

explicación es que las proporciones de mineralización ocurren de forma gradual en el biofertilizante aplicado, debido a las sustancias en descomposición como la composta con una relación de C:N baja (Robertson and Groffman 2015). Manojlović, Čabilovski & Bavec, (2010) mostraron que el N puede ser inmovilizado en enmiendas orgánicas con menores contenidos de N y mayores proporciones de C: N.

Los microorganismos en el tratamiento con Biofertilizante (principalmente *Lactobacillus spp*) no mostraron un efecto directo sobre el crecimiento del maíz. Solamente, en el día 44 se encontró un incremento en la longitud de la raíz en el tratamiento con biofertilizante estéril (BE). El efecto del Biofertilizante sobre el Crecimiento vegetal ha sido reportado como positivo, negativo o ningún efecto (Megali, Glauser, and Rasmann 2013; Mayer et al. 2010a; Javaid 2011). Mayer et al. (2010) aplicaron dos tipos de biofertilizantes por cuatro años y no se encontró un efecto significativo en cultivo en campo, biomasa de suelo, actividad microbiana del suelo y la estructura de la comunidad. Mientras, Limanska et al. (2013) reportaron que *Lactobacillus plantarum* incrementó la germinación, la longitud de brote y raíz en tomates (*Lycopersicon esculentum*). Javaid (2011) aplicó un biofertilizante con bacterias ácido lácticas a un suelo tratado con heces de vaca, que incrementó el crecimiento del brote y la raíz en arroz (*Oriza sativa L.*). Estos autores, no usaron un control del Biofertilizante estéril, por lo cual no se puede separar un efecto directo del contenido orgánico de la aplicación de los microorganismos solamente.

Algunos investigadores han reportado diversos resultados con la aplicación de biofertilizantes a cultivos. Megali et al. (2015) encontraron un incremento en la biomasa en diferentes cultivos en condiciones de invernadero. En un experimento similar, pero en campo con maíz tratado con un biofertilizante no se encontró ningún incremento en la biomasa de la planta (Megali, Glauser, and Rasmann 2013). Similarmente, Cipriano et al. (2016) aplicaron *Pseudomonas* como biofertilizante en un experimento en invernadero, no se encontró un incremento del crecimiento durante la fase de germinación. Pero, bajo condiciones de campo se incrementó el tamaño de la raíz en la planta significativamente. Estas investigaciones no incluían un control del biofertilizante estéril. De igual forma, Wang et al., (2019) reportaron que solamente un tratamiento con biofertilizante estéril incrementó la biomasa de la raíz. Esto podría indicar que

no solamente, las comunidades bacterianas en el biofertilizante juegan un papel importante en el crecimiento vegetal. Es posible, que los nutrientes en el biofertilizante que fue esterilizado en autoclave puedan estimular el crecimiento de la raíz en el suelo. Ya que el biofertilizante estéril contiene nutrientes que podrían estimular el crecimiento las bacterias autóctonas en el suelo, lo que resulta en un mayor ciclo de nutrientes, promueve la función del ecosistema y mejora la producción de hormonas (Farrell et al. 2010; Odlare et al. 2011).

El análisis discriminante por el efecto de tamaño LEfSe identificó algunos géneros como biomarcadores potenciales en el biofertilizante usado en este estudio, son principalmente bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*. En algunos estudios previos se han encontrado bacterias como *Latobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus* en mayor cantidad en biofertilizantes comerciales (Hanapi et al., 2013; Raimi, Ezeokoli & Adeleke, 2019). Algunas de estas bacterias ácido lácticas pueden ser usadas como biofertilizantes, biocontrol de parásitos o como bioestimulantes. Otra función es el mejoramiento de la disponibilidad de nutrientes desde la composta u otros materiales orgánicos (Lamont et al. 2017).

A pesar de la importancia que tienen los microorganismos presentes en el biofertilizante para la rizósfera del maíz. La aplicación de biofertilizante mostró pocas variaciones en los géneros asociados a la persistencia bacteriana en suelos no cultivados. Mientras que, se encontraron algunos cambios en el suelo en la rizósfera y en el suelo no rizosférico en la composición bacteriana al aplicar el biofertilizante. Esto puede explicarse por qué al usar un biofertilizante como estrategia podría favorecer al microbioma en la rizósfera, en comparación con el suelo control. Por ejemplo, la aplicación de biofertilizantes puede ser una estrategia competitiva importante en la rizósfera, donde una mayor disponibilidad de nutrientes da como resultado una mayor densidad de población dentro de los nichos localizados, lo que lleva a una mayor interacción entre las bacterias que en el suelo no cultivado y el suelo no rizosférico (Hinsinger et al. 2009; Philippot et al. 2013).

Wang et al. (2019) reportaron que la aplicación de un biofertilizante estéril tiene un efecto similar sobre las poblaciones bacterianas como la aplicación de un biofertilizante en el suelo. Esto

indicó que el sustrato añadido con el biofertilizante afectó la comunidad bacteriana y no los microorganismos (Mayer et al. 2010b; M. Wang et al. 2019). En este estudio, la aplicación del biofertilizante o el biofertilizante estéril tuvieron un pequeño efecto sobre la estructura de la comunidad bacteriana.

La aplicación regular del biofertilizante entre el día 44 y el día 130 tiene un efecto limitado sobre la estructura de la comunidad bacteriana. Adicionalmente, solo un número limitado de grupos bacterianos cambiaron su abundancia relativa en el suelo al que se le aplicó el biofertilizante. Como tal, la mayoría de las bacterias en el biofertilizante no alteraron la estructura de la comunidad bacteriana. Sería interesante investigar, si las bacterias en el biofertilizante sobrevivirían, a otras condiciones experimentales a las utilizadas en este estudio y si lo mismo sucediese con los miembros de un consorcio diferente.

La forma en que los grupos bacterianos se vean afectados por la rizósfera dependerá de factores como las condiciones del suelo, por ejemplo, la temperatura y el contenido de agua, las características del suelo, por ejemplo, la distribución del tamaño de las partículas, la disponibilidad y composición de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, nitrógeno y fósforo, el tipo de planta cultivada, la competencia microbiana y las capacidades metabólicas bacterianas. En este estudio, las condiciones del suelo, es decir, el contenido de agua y la temperatura, y las características del suelo, como la distribución del tamaño de partícula, eran las mismas, por lo que la materia orgánica del suelo y el contenido de nutrientes eran las diferencias más importantes entre el suelo no cultivado y el suelo de la rizosfera.

Algunos grupos bacterianos pueden afectarse en la rizósfera por factores como las condiciones del suelo, temperatura, contenido de agua, pH, competencia microbiana, depredación y capacidades metabólicas, entre otras causas (Rousk et al. 2010; Fierer and Jackson 2006; Pandey and Yarzabal 2019; Suleiman et al. 2019; Acea, Moore, and Alexander 1988). En este estudio las condiciones del suelo son las mismas, el contenido de agua, el tamaño de partículas fue el mismo, entonces el contenido de la materia orgánica en el suelo y el contenido de nutrientes fue la más

importante diferencia entre el suelo no cultivado y la rizósfera. La liberación de exudados por las plantas y las raíces dañadas, aumenta fácilmente la descomposición de la materia orgánica en la rizósfera.

El contenido de nutrientes de la rizósfera es diferente que el de un suelo sin cultivar, como las plantas requieren nutrientes como N, P y K para su crecimiento y compiten con los microorganismos por estos. Otras características del suelo que podrían ayudarnos a diferenciar entre el suelo sin cultivar y la rizósfera, pero estos cambios pueden ser asumidos como pequeños, por ejemplo, el pH, el contenido de agua y la concentración de oxígeno. Entonces, puede que los posibles efectos sobre la estructura de la comunidad bacteriana sean pequeños (Wu et al. 2017; Mickan et al. 2019).

Algunos de los géneros más abundantes encontrados en la rizósfera del maíz en este estudio son conocidos por su capacidad de favorecer el ambiente de la raíz, por ejemplo, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Vieira et al. 2020). Algunos miembros de *Burkholderia* han sido descritos como bacterias solubilizadoras de fosfato (Panhwar et al. 2014) y también filotipos de *Burkholderia* se han encontrado enriquecidos en la rizósfera (Yadav et al. 2018; Zhang et al. 2017). En el caso de *Agrobacterium* se ha reportado en diferentes ambientes (suelo sin cobertura vegetal, rizósfera, plantas hospederas) y son casi siempre parte de la rizósfera central del microbioma (Xu et al. 2018). *Rhizobium leguminosarum* es una bacteria fijadora de N₂ que vive en simbiosis con leguminosas (Cavassim et al. 2020), también puede adaptarse bien en la rizósfera de otras plantas. Algunas especies de *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. putida*, fue abundante en la rizósfera del maíz como en este estudio (Neal et al. 2012). Sin embargo, Yang et al. (2017) reportaron que su abundancia relativa puede disminuir en la rizósfera. Como lo hemos mencionado no solamente el cultivo de una planta determina si un grupo bacteriano se enriquece, pero también los factores ambientales juegan un papel importante, así como las características del suelo y de la planta.

La abundancia relativa de algunos géneros bacterianos fue altamente variable en el tiempo en la rizósfera comparado con el suelo sin cultivar, por ejemplo, *Acinetobacter*, *Delftia*, *Halomonas*, *Lactobacillus*. Esto podría ser explicado por los cambios que ocurren en el tiempo en el material

orgánico, los nutrientes y la competencia con otras bacterias, que estarían determinando estas fluctuaciones, pero no es muy claro por qué estos grupos bacterianos muestran variaciones tan grandes en el tiempo. En particular, muchos miembros de *Halomonas* son halotolerantes o halófilas y oligotróficas (Fernández-Gómez et al. 2019), mientras que algunos filotipos que están asociados a *Acinetobacter* son nitrificadores heterotróficos y desnitrificadores aeróbicos, son encontrados en ecosistemas oligotróficos con una alta tolerancia a condiciones extremas (Su et al. 2015; Mogul et al. 2018). En contraste, algunas especies de *Delftia* tienen la capacidad de estimular el crecimiento vegetal por su capacidad de antagonismo con patógenos y su capacidad de hacer fijación de N (Han et al. 2005)

7. Conclusión

En este estudio se evidenció que la aplicación del biofertilizante o el biofertilizante estéril con solo nutrientes no tuvo un efecto significativo en el desarrollo del maíz y tuvo un efecto restringido en la abundancia relativa de la comunidad bacteriana del suelo. Por su parte, el cultivo de maíz sí tuvo un efecto significativo en la estructura de la comunidad bacteriana y esta fue diferente en la rizósfera a la del suelo no cultivado. Se observó un cambio significativo en el tiempo independientemente del cultivo de maíz o la aplicación de biofertilizantes y su variación en el tiempo fue mayor que la de la aplicación de biofertilizantes o el cultivo de maíz.

8. Recomendaciones

Es importante tener en cuenta que este experimento se realizó en condiciones de invernadero. Por lo cual la aplicación del biofertilizante en un experimento en campo podría ser necesaria para investigar más a fondo la capacidad de estimulación del crecimiento de las plantas del biofertilizante. Además, valdría la pena investigar el efecto del biofertilizante en otros tipos de cultivos en diferentes agroecosistemas.

9. Referencias:

Acea, Maria J., Carolyn R. Moore, and Martin Alexander. 1988. "Survival and Growth of

- Bacteria Introduced into Soil.” *Soil Biology and Biochemistry*.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90066-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90066-1).
- Al-Enazy, Abdul Aziz R., Saud S. Al-Oud, Fahad N. Al-Barakah, and Adel R.A. Usman. 2017. “Role of Microbial Inoculation and Industrial By-Product Phosphogypsum in Growth and Nutrient Uptake of Maize (*Zea Mays* L.) Grown in Calcareous Soil.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (11): 3665–74. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8226>.
- Alexandratos, Nikos, and Jelle Bruinsma. 2012. “The 2012 Revision World Agriculture: Towards 2030/2050 WORLD.” *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Roma. [https://doi.org/10.1016/S0264-8377\(03\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0264-8377(03)00047-4).
- Ali, Muhammad Amjad, Muhammad Naveed, Adnan Mustafa, and Amjad Abbas. 2017. “The Good, the Bad, and the Ugly of Rhizosphere Microbiome.” In *Probiotics and Plant Health*, 253–90. Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_11.
- Bakker, M G, J M Chaparro, D K Manter, and J M Vivanco. 2015. “Impacts of Bulk Soil Microbial Community Structure on Rhizosphere Microbiomes of *Zea Mays*.” *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2446-0>.
- Bákonyi, N., S. Bott, É Gajdos, A. Szabó, A. Jakab, B. Tóth, P. Makleit, and Sz Veres. 2013. “Using Biofertilizer to Improve Seed Germination and Early Development of Maize.” *Polish Journal of Environmental Studies*.
- Barragán-Ocaña, Alejandro, and María del Carmen Del-Valle-Rivera. 2016. “Rural Development and Environmental Protection through the Use of Biofertilizers in Agriculture: An Alternative for Underdeveloped Countries?” *Technology in Society* 46: 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2016.06.001>.
- Bashan, Y, G Holguin, and L E Bashan. 2004. “Azospirillum-Plant Relationships: Agricultural, Physiological, Molecular and Environmental Advances (1997--2003).” *Can J Microbiol* 50. <https://doi.org/10.1139/w04-035>.
- Bhardwaj, Deepak, Mohammad Wahid Ansari, Ranjan Kumar Sahoo, and Narendra Tuteja. 2014. “Biofertilizers Function as Key Player in Sustainable Agriculture by Improving Soil Fertility, Plant Tolerance and Crop Productivity.” *Microbial Cell Factories* 13 (May): 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>.
- Caporaso, J. Gregory, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Todd Z. Desantis, Gary L. Andersen, and Rob Knight. 2010. “PyNAST: A Flexible Tool for Aligning Sequences to a Template Alignment.” *Bioinformatics* 26 (2): 266–67. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp636>.

- Caporaso, J Gregory, Justin Kuczynski, and et al. 2010. "QIIME Allows High Throughput Community Sequencing Data." *Nature Methods* 7 (5): 335–36.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>.
- Cavassim, Maria Izabel A., Sara Moeskjær, Camous Moslemi, Bryden Fields, Asger Bachmann, Bjarni J. Vilhjálmsson, Mikkel Heide Schierup, J. Peter W. Young, and Stig U. Andersen. 2020. "Symbiosis Genes Show a Unique Pattern of Introgression and Selection within a *Rhizobium Leguminosarum* Species Complex." *Microbial Genomics* 6 (4): e000351.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000351>.
- Ceja-Navarro, Javier A., Flor N. Rivera, Leonardo Patiño-Zúñiga, Bram Govaerts, Rodolfo Marsch, Antón Vila-Sanjurjo, and Luc Dendooven. 2010. "Molecular Characterization of Soil Bacterial Communities in Contrasting Zero Tillage Systems." *Plant and Soil* 329 (1–2): 127–37. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0140-9>.
- Chauhan, Puneet Singh, Vasvi Chaudhry, Sandhya Mishra, and Chandra Shekhar Nautiyal. 2011. "Uncultured Bacterial Diversity in Tropical Maize (*Zea Mays* L.) Rhizosphere." *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000171>.
- Cipriano, Matheus A. P., Manoeli Lupatini, Lucilene Lopes-Santos, Márcio J. da Silva, Luiz F. W. Roesch, Suzete A. L. Destéfano, Sueli S. Freitas, and Eiko E. Kuramae. 2016. "Lettuce and Rhizosphere Microbiome Responses to Growth Promoting *Pseudomonas* Species under Field Conditions." Edited by Angela Sessitsch. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (12): 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw197>.
- Cummings, Stephen P. 2009. "The Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Low Input and Organic Cultivation of Graminaceous Crops; Potential and Problems*." *ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY*.
- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. 2006. "Greengenes, a Chimera-Checked 16S RRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7): 5069–72. <https://doi.org/10.1128/aem.03006-05>.
- Dodd, Ian C., and Juan Manuel Ruiz-Lozano. 2012. "Microbial Enhancement of Crop Resource Use Efficiency." *Current Opinion in Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.005>.
- Doran, John W., and Michael R. Zeiss. 2000. "Soil Health and Sustainability: Managing the Biotic Component of Soil Quality." *Applied Soil Ecology*. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6).

- Eaton, D. L., S. Clesceri, E. W. Rice, and A. E. Greenberg. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition*. Edited by Andrew Eaton, Lenore Clesceri, Eugene Rice, and Arnold Greenberg. 21st ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association (APHA).
- Edgar, R.C. 2010. “Search and Clustering Hundreds of Times Faster than BLAST.” *Bioinformatics* 26 (19): 2460–61. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.
- Elsas, J.D. Van, C.E. Heijnen, and J.A van Veen. 1991. “The Fate of Introduced Genetically Engineered Microorganisms (GEMs) in Soil, in Microcosms and the Field: Impact of Soil Textural Aspects.” In *Biological Monitoring of Genetically Engineered Plants and Microbes*, edited by D.R. MacKenzie and S.C. Henry, 67–79. Agricultural Research Institute, Bethesda, MD.
- Evans, J., C. Wallace, and N. Dobrowolski. 1993. “Interaction of Soil Type and Temperature on the Survival of *Rhizobium Leguminosarum* Bv. *Viciae*.” *Soil Biology and Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90209-T](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90209-T).
- Faramarzi, Ali, Mohammad Ali Pourgorban, Mohammad Hossein Ansari, and Reza Taghizadeh. 2012. “The Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Inoculation on the Yield and Yield Components of Grain Corn (*Zea Mays* L.) in Astara, Iran.” *Journal of Food, Agriculture & Environmental* 10 (1): 299–301. <https://doi.org/10.1234/4.2012.2627>.
- Farrell, Mark, Gareth W. Griffith, Phil J. Hobbs, William T. Perkins, and Davey L. Jones. 2010. “Microbial Diversity and Activity Are Increased by Compost Amendment of Metal-Contaminated Soil.” *FEMS Microbiology Ecology* 71 (1): 94–105. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00793.x>.
- Fernández-Gómez, Beatriz, Beatriz Díez, Martin F. Polz, José Ignacio Arroyo, Fernando D. Alfaro, Germán Marchandon, Cynthia Sanhueza, et al. 2019. “Bacterial Community Structure in a Sympagic Habitat Expanding with Global Warming: Brackish Ice Brine at 85–90 °N.” *ISME Journal* 13 (2): 316–33. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0268-9>.
- Ferreira, de Araújo Ademir Sérgio, and Wanderley José de Melo. 2010. “Soil Microbial Biomass in Organic Farming System.” *Ciência Rural* 40 (11): 2419–26. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000192>.
- Fierer, Noah, and Robert Jackson. 2006. “The Diversity and Biogeography of Soil Bacterial Communities.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (3): 626–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>.

- Frey-Klett, Pascale, Jean Claude Pierrat, and Jean Garbaye. 1997. "Location and Survival of Mycorrhiza Helper *Pseudomonas Fluorescens* during Establishment of Ectomycorrhizal Symbiosis between *Laccaria Bicolor* and Douglas Fir." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1): 139–44.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389093/pdf/hw0139.pdf>.
- Gee, G.W., and J. W. Bauder. 1986. "Particle-Size Analysis." In *Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods, 5.1, Second Edition*, edited by A. Klute, Second, 383–411. Madison: SSSA Book Series. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c15>.
- Giassi, Valdionei, Camila Kiritani, and Katia Cristina Kupper. 2016. "Bacteria as Growth-Promoting Agents for Citrus Rootstocks." *Microbiological Research* 190 (September): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>.
- Gloor, Greg, Andrew Fernandes, Jean Macklaim, Arianne Albert, Matt Links, Thomas Quinn, Jia Rong Wu, Ruth Grace Wong, and Brandon Lieng Maintainer. 2019. "Analysis of Differential Abundance Taking Sample Variation Into Account: Package 'ALDEx2.'" 2019. https://doi.org/https://github.com/ggloor/ALDEx_bioc.
- González Merino, A., and J.F. Ávila Castañeda. 2014. "El Maíz En Estados Unidos y En México: Hegemonía En La Producción de Un Cultivo." *Argumentos, UAM-Xochimilco*.
- Gray, E. J., and D. L. Smith. 2005. "Intracellular and Extracellular PGPR: Commonalities and Distinctions in the Plant-Bacterium Signaling Processes." *Soil Biology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>.
- Green, Michael R., and Joseph Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Han, Jigang, Lei Sun, Xiuzhu Dong, Zhengqiu Cai, Xiaolu Sun, Hailian Yang, Yunshan Wang, and Wei Song. 2005. "Characterization of a Novel Plant Growth-Promoting Bacteria Strain *Delftia Tsuruhensis* HR4 Both as a Diazotroph and a Potential Biocontrol Agent against Various Plant Pathogens." *Systematic and Applied Microbiology* 28 (1): 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.003>.
- Hanapi, Siti Zulaiha, H M Awad, S A Sheikh Imranudin, M S Siti Hajar, Mohamad Roji Sarmidi, and Ramlan Aziz. 2013. "Agriculture Wastes Conversion for Biofertilizer Production Using Beneficial Microorganisms for Sustainable Agriculture Applications." *Malaysian Journal of Microbiology* 9 (1): 60–67. <https://doi.org//10.21161/mjm.43812>.
- Herlemann, Daniel PR, Matthias Labrenz, Klaus Jürgens, Stefan Bertilsson, Joanna J Wanick,

- and Anders F Andersson. 2011. "Transitions in Bacterial Communities along the 2000 Km Salinity Gradient of the Baltic Sea." *The ISME Journal* 5 (10): 1571–79.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>.
- Hinsinger, Philippe, A. Glyn Bengough, Doris Vetterlein, and Iain M. Young. 2009. "Rhizosphere: Biophysics, Biogeochemistry and Ecological Relevance." *Plant and Soil* 321 (1–2): 117–52. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9885-9>.
- Hoffman, Charles S., and Fred Winston. 1987. "A Ten-Minute DNA Preparation from Yeast Efficiently Releases Autonomous Plasmids for Transformation of Escherichia Coli." *Gene* 57 (2–3): 267–72. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4).
- Javaid, Arshad. 2011. "Effects of Biofertilizers Combined with Different Soil Amendments on Potted Rice Plants." *Chilean Journal of Agricultural Research* 71 (1): 158–62.
<https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000100019>.
- Jousset, Alexandre, Laurène Rochat, Stefan Scheu, Michael Bonkowski, and Christoph Keel. 2010. "Predator-Prey Chemical Warfare Determines the Expression of Biocontrol Genes by Rhizosphere-Associated Pseudomonas Fluorescens." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15): 5263–68. <https://doi.org/10.1128/AEM.02941-09>.
- Kolde, Raivo. 2019. "Pretty Heatmaps: Pheatmap." 2019.
<https://doi.org/ct.org/web/packages/pheatmap/index.html>.
- Kozdrój, J., J. T. Trevors, and J. D. Van Elsas. 2004. "Influence of Introduced Potential Biocontrol Agents on Maize Seedling Growth and Bacterial Community Structure in the Rhizosphere." *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1775–1784.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.034>.
- Kumar, M., D.P. Singh, R. Prabha, A.K. Rai, and L. Sharma. 2016. *Role of Microbial Inoculants in Nutrient Use Efficiency. Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_9.
- Lamont, John R., Olivia Wilkins, Margaret Bywater-Ekegård, and Donald L. Smith. 2017. "From Yogurt to Yield: Potential Applications of Lactic Acid Bacteria in Plant Production." *Soil Biology and Biochemistry* 111 (August): 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.015>.
- Limanska, Nataliya, Tetiana Ivanytsia, Olena Basiul, Kateryna Krylova, Vanessa Biscola, Jean-Marc Chobert, Volodymyr Ivanytsia, and Thomas Haertlé. 2013. "Effect of Lactobacillus plantarum on Germination and Growth of Tomato Seedlings." *Acta*

- Physiologiae Plantarum* 35 (5): 1587–95. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1200-y>.
- López-Valdez, F., F. Fernández-Luqueño, J. M. Ceballos-Ramírez, R. Marsch, V. Olalde-Portugal, and L. Dendooven. 2011. “A Strain of *Bacillus Subtilis* Stimulates Sunflower Growth (*Helianthus Annuus* L.) Temporarily.” *Scientia Horticulturae* 128 (4): 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.006>.
- Mair, Patrick, and Rand Wilcox. 2019. “Package ‘WRS2’ Type Package Title A Collection of Robust Statistical Methods.” 2019. <https://r-forge.r-project.org/projects/psychor/>.
- . 2020. “Robust Statistical Methods in R Using the WRS2 Package.” *Behavior Research Methods* 52 (2): 464–88. <https://doi.org/10.3758/s13428-019-01246-w>.
- Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, et al. 2006. “Comparative Genomics of the Lactic Acid Bacteria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (42): 15611–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>.
- Malusà, E., F. Pinzari, and L. Canfora. 2016. “Efficacy of Biofertilizers: Challenges to Improve Crop Production.” In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4_2.
- Manojlović, Maja, Ranko Čabilovski, and Martina Bavec. 2010. “Organic Materials: Sources of Nitrogen in the Organic Production of Lettuce.” *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 34 (2): 163–72. <https://doi.org/10.3906/tar-0905-11>.
- Martínez-Viveros, O, M.a A Jorquera, D.E E Crowley, G Gajardo, and M.L L Mora. 2010. “Mechanisms and Practical Considerations Involved in Plant Growth Promotion By Rhizobacteria.” *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>.
- Martins, Layla Farage, Luciana Principal Antunes, Renata C. Pascon, Julio Cezar Franco de Oliveira, Luciano A. Digiampietri, Deibs Barbosa, Bruno Malveira Peixoto, et al. 2013. “Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms.” *PLoS ONE* 8 (4): e61928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061928>.
- Mayer, Jochen, Susanne Scheid, Franco Widmer, Andreas Fließbach, and Hans-Rudolf Oberholzer. 2010a. “How Effective Are ‘Effective Microorganisms® (EM)’? Results from a Field Study in Temperate Climate.” *Applied Soil Ecology* 46 (2): 230–39. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2010.08.007>.
- . 2010b. “How Effective Are ‘Effective Microorganisms® (EM)’? Results from a Field

- Study in Temperate Climate.” *Applied Soil Ecology* 46 (2): 230–39.
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2010.08.007>.
- McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2013. “Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data.” *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Megali, L., G. Glauser, and S. Rasmann. 2013. “Fertilization with Beneficial Microorganisms Decreases Tomato Defenses against Insect Pests.” *Agronomy for Sustainable Development* 34 (3): 649–56. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0187-0>.
- Mickan, Bede S, Lynette K Abbott, Zakaria M Solaiman, Falko Mathes, Kadambot H M Siddique, and Sasha N Jenkins. 2019. “Soil Disturbance and Water Stress Interact to Influence Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Rhizosphere Bacteria and Potential for N and C Cycling in an Agricultural Soil.” *Biology and Fertility of Soils* 55 (1): 53–66.
<https://doi.org/10.1007/s00374-018-1328-z>.
- Miransari, Mohammad. 2011. “Soil Microbes and Plant Fertilization.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3521-y>.
- Mogul, Rakesh, Gregory A. Barding, Sidharth Lalla, Sooji Lee, Steve Madrid, Ryan Baki, Mahjabeen Ahmed, et al. 2018. “Metabolism and Biodegradation of Spacecraft Cleaning Reagents by Strains of Spacecraft-Associated Acinetobacter.” *Astrobiology* 18 (12): 1517–27. <https://doi.org/10.1089/ast.2017.1814>.
- Mohammadi, K, and Y Yousef Sohrabi. 2012. “Bacterial Biofertilizers for Sustainable Crop Production: A Review.” *Journal of Agricultural Biological Science* 7 (5): 309–16.
- Mohite, B. 2013. “Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid (IAA) Producing Bacteria from Rhizospheric Soil and Its Effect on Plant Growth.” *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13 (3): 638–49. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>.
- Mulvaney, R.L. 1996. “Nitrogen - Inorganic Forms.” In *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, edited by D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, and M. E. Sumner, 1123–84. Madison: SSSA Book Series. <https://doi.org/https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c38>.
- Neal, Andrew L, Shakoor Ahmad, Ruth Gordon-Weeks, and Jurriaan Ton. 2012. “Benzoxazinoids in Root Exudates of Maize Attract *Pseudomonas Putida* to the Rhizosphere.” *PLOS ONE* 7 (4): e35498.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035498>.
- Nuzzo, Andrea, Aditi Satpute, Ute Albrecht, and Sarah L. Strauss. 2020. “Impact of Soil

- Microbial Amendments on Tomato Rhizosphere Microbiome and Plant Growth in Field Soil.” *Microbial Ecology*, March. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01497-7>.
- Odlare, M., V. Arthurson, M. Pell, K. Svensson, E. Nehrenheim, and J. Abubaker. 2011. “Land Application of Organic Waste – Effects on the Soil Ecosystem.” *Applied Energy* 88 (6): 2210–18. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.043>.
- Oksanen, Jari, F Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan Mcglinn, Peter R Minchin, et al. 2019. “Vegan: Community Ecology Package.” *CRAN V2.5-6*: 1–298. <https://doi.org/https://github.com/vegandevs/vegan>.
- Paliwal, I. 2001. “El Maíz En Los Trópicos: Mejoramiento y Producción.” *Fao*. <https://doi.org/Deposito de Documentos de la FAO>.
- Pandey, Anita, and Luis Andrés Yarzabal. 2019. “Bioprospecting Cold-Adapted Plant Growth Promoting Microorganisms from Mountain Environments.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (2): 643–57. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9515-2>.
- Panhwar, Qurban Ali, Umme Aminun Naher, Shamshuddin Jusop, Radziah Othman, Md Abdul Latif, and Mohd Razi Ismail. 2014. “Biochemical and Molecular Characterization of Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria in Acid Sulfate Soils and Their Beneficial Effects on Rice Growth.” Edited by Luis Herrera-Estrella. *PLoS ONE* 9 (10): e97241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>.
- Parikh, Sanjai J., and Bruce R. James. 2012. “Soil: The Foundation of Agriculture Agriculture.” *Nature Education Knowledge*.
- Pathak, D. V., and Mukesh Kumar. 2016. “Microbial Inoculants as Biofertilizers and Biopesticides.” In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives*. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_11.
- Peiffer, Jason A, Aymé Spor, Omry Koren, Zhao Jin, Susannah Green Tringe, Jeffery L Dangl, Edward S Buckler, and Ruth E Ley. 2013. “Diversity and Heritability of the Maize Rhizosphere Microbiome under Field Conditions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (16): 6548–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>.
- Philippot, Laurent, Jos M. Raaijmakers, Philippe Lemanceau, and Wim H. Van Der Putten. 2013. “Going Back to the Roots: The Microbial Ecology of the Rhizosphere.” *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>.
- Pindi, P K, and S D V Satyanarayana. 2012. “Liquid Microbial Consortium- a Potential Tool for Sustainable Soil Health.” *J Biofertil Biopest* 3.

- Postma, J., C. H. Hok-A-Hin, and J. A. van Veen. 1990. "Role of Microniches in Protecting Introduced *Rhizobium Leguminosarum* Biovar *Trifolii* against Competition and Predation in Soil." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (2).
- Quattrini, Mattia, Cristian Bernardi, Milda Stuknytė, Fabio Masotti, Alessandro Passera, Giovanni Ricci, Lisa Vallone, Ivano De Noni, Milena Brasca, and Maria Grazia Fortina. 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 (April): 936–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.074>.
- R Core Team, Development. 2016. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." *R Foundation for Statistical Computing* 1: 409. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74686-7>.
- Raiesi, Fayez. 2006. "Carbon and N Mineralization as Affected by Soil Cultivation and Crop Residue in a Calcareous Wetland Ecosystem in Central Iran." *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112 (1): 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.07.002>.
- Raimi, Adekunle R., Obinna T. Ezeokoli, and Rasheed A. Adeleke. 2019. "High-Throughput Sequence Analysis of Bacterial Communities in Commercial Biofertiliser Products Marketed in South Africa: An Independent Snapshot Quality Assessment." *3 Biotech* 9 (3): 108. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1643-6>.
- Ranum, Peter, Juan Pablo Peña-Rosas, and Maria Nieves Garcia-Casal. 2014. "Global Maize Production, Utilization, and Consumption." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312 (1): 105–12. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>.
- Reddy, Chilekampalli A., and Ramu S. Saravanan. 2013. "Polymicrobial Multi-Functional Approach for Enhancement of Crop Productivity." *Advances in Applied Microbiology* 82: 53–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00003-X>.
- Richter, Daniel D., Neung-Hwan Oh, Ryan Fimmen, and Jason Jackson. 2007. "Chapter 8 - The Rhizosphere and Soil Formation." In *The Rhizosphere*.
- Robertson, G.P., and P.M. Groffman. 2015. "Nitrogen Transformations." In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, edited by Eldor A. Paul, 4th edn, 421–46. London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00014-1>.
- Rousk, Johannes, Erland Bååth, Philip C Brookes, Christian L Lauber, Catherine Lozupone, J Gregory Caporaso, Rob Knight, and Noah Fierer. 2010. "Soil Bacterial and Fungal Communities across a PH Gradient in an Arable Soil." *The Isme Journal* 4 (May): 1340–

51. <https://doi.org/10.0.4.14/ismej.2010.58>.
- Sruthilaxmi, C.B., and S. Babu. 2017. "Microbial Bio-Inoculants in Indian Agriculture: Ecological Perspectives for a More Optimized Use." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 242 (May): 23–25. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.03.019>.
- Statista. 2016. "Bekleidung - Europa | Statista Marktprognose." Statista. 2016.
- Su, Jun Feng, Kai Zhang, Ting Lin Huang, Gang Wen, Lin Guo, and Shao Fei Yang. 2015. "Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification at Low Nutrient Conditions by a Newly Isolated Bacterium, *Acinetobacter* Sp. SYF26." *Microbiology (United Kingdom)* 161 (4): 829–37. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000047>.
- Suleiman, Afnan K.A., Paula Harkes, Sven van den Elsen, Martijn Holterman, Gerard W. Korthals, Johannes Helder, and Eiko E. Kuramae. 2019. "Organic Amendment Strengthens Interkingdom Associations in the Soil and Rhizosphere of Barley (*Hordeum Vulgare*)." *Science of The Total Environment* 695 (December): 133885. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.133885>.
- Sun, Ruibo, Xue-Xian Zhang, Xisheng Guo, Daozhong Wang, and Haiyan Chu. 2015. "Bacterial Diversity in Soils Subjected to Long-Term Chemical Fertilization Can Be More Stably Maintained with the Addition of Livestock Manure than Wheat Straw." *Soil Biology and Biochemistry* 88 (September): 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.007>.
- Swapna, G, M Divya, and G P Brahmaprakash. 2016. "Survival of Microbial Consortium in Granular Formulations, Degradation and Release of Microorganisms in Soil." *Annals of Plant Sciences* 5 (05): 1348–52. <https://doi.org/10.21746/aps.2016.05.004>.
- Trabelsi, Darine, and Ridha Mhamdi. 2013. "Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review." *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/863240>.
- Trabelsi, Darine, Ridha Mhamdi, Darine Trabelsi, and Ridha Mhamdi. 2013. "Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review." *BioMed Research International* 2013: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/863240>.
- Uroz, Stéphane, Panos Ioannidis, Juliette Lengelle, Aurélie Cébron, Emmanuelle Morin, Marc Buée, and Francis Martin. 2013. "Functional Assays and Metagenomic Analyses Reveals Differences between the Microbial Communities Inhabiting the Soil Horizons of a Norway Spruce Plantation." Edited by Jack Anthony Gilbert. *PLoS ONE* 8 (2): e55929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055929>.

- Valenzuela-Encinas, César, Isabel Neria-González, Rocio J. Alcántara-Hernández, J. Arturo Enríquez-Aragón, Isabel Estrada-Alvarado, César Hernández-Rodríguez, Luc Dendooven, and Rodolfo Marsch. 2008. “Phylogenetic Analysis of the Archaeal Community in an Alkaline-Saline Soil of the Former Lake Texcoco (Mexico).” *Extremophiles* 12 (2): 247–254. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0121-y>.
- Veen, J A van, L S van Overbeek, and J D van Elsas. 1997. “Fate and Activity of Microorganisms Introduced into Soil.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*.
- Vieira, Selma, Johannes Sikorski, Sophie Dietz, Katharina Herz, Marion Schrumpf, Helge Bruelheide, Dierk Scheel, Michael W. Friedrich, and Jörg Overmann. 2020. “Drivers of the Composition of Active Rhizosphere Bacterial Communities in Temperate Grasslands.” *ISME Journal* 14 (2): 463–75. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0543-4>.
- Wang, Meng, Shanshan Li, Shibao Chen, Nan Meng, Xiaoyue Li, Han Zheng, Chunmei Zhao, and Duo Wang. 2019. “Manipulation of the Rhizosphere Bacterial Community by Biofertilizers Is Associated with Mitigation of Cadmium Phytotoxicity.” *Science of The Total Environment* 649 (February): 413–21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.174>.
- Wang, Qiong, George M Garrity, James M Tiedje, and James R Cole. 2007. “Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of RRNA sequences into the New Bacterial Taxonomy.” *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Wu, Yucheng, Jun Zeng, Qinghe Zhu, Zhenfa Zhang, and Xiangui Lin. 2017. “PH Is the Primary Determinant of the Bacterial Community Structure in Agricultural Soils Impacted by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution.” *Scientific Reports* 7 (1): 40093. <https://doi.org/10.1038/srep40093>.
- Xiong, Wu, Sai Guo, Alexandre Jousset, Qingyun Zhao, Huasong Wu, Rong Li, George A. Kowalchuk, and Qirong Shen. 2017. “Bio-Fertilizer Application Induces Soil Suppressiveness against Fusarium Wilt Disease by Reshaping the Soil Microbiome.” *Soil Biology and Biochemistry* 114 (November): 238–47. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2017.07.016>.
- Xu, Jin, Yunzeng Zhang, Pengfan Zhang, Pankaj Trivedi, Nadia Riera, Yayu Wang, Xin Liu, et al. 2018. “The Structure and Function of the Global Citrus Rhizosphere Microbiome.” *Nature Communications* 9 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07343-2>.

- Yadav, Ajar Nath, Priyanka Verma, Sunil Kumar, Vinod Kumar, Manish Kumar, Thankappan Chellammal Kumari Sugitha, Bhim P. Singh, Anil Kumar Saxena, and Harcharan Singh Dhaliwal. 2018. "Actinobacteria from Rhizosphere: Molecular Diversity, Distributions, and Potential Biotechnological Applications." In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications*, edited by Bhim Pratap Singh, Vijai Kumar Gupta, and Ajit Kumar Passari, 1st edn, 13–41. Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00002-3>.
- Yang, Yi, Na Wang, Xinyan Guo, Yi Zhang, and Boping Ye. 2017. "Comparative Analysis of Bacterial Community Structure in the Rhizosphere of Maize by High-Throughput Pyrosequencing." *PLOS ONE* 12 (5): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178425>.
- Yazdani, Mohammad, Mohammad Ali Bahnmanyar, Hemmatollah Pirdashti, and Mohammad Ali Esmaili. 2009. "Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield and Yield Components of Corn (*Zea Mays* L.)." *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*.
- Zhang, Yuting, Hong Shen, Xinhua He, Ben W Thomas, Newton Z Lupwayi, Xiying Hao, Matthew C Thomas, and Xiaojun Shi. 2017. "Fertilization Shapes Bacterial Community Structure by Alteration of Soil PH." *Frontiers in Microbiology* 8: 1325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01325>.