



**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS**

**POSGRADO EN BIOCENCIAS**

---

**EVALUACIÓN DEL CICLO DEL NITRÓGENO EN  
UN SUELO AGRÍCOLA PERTURBADO CON  
COMPUESTOS M-SALFEN DE NÍQUEL Y ZINC.**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN BIOCENCIAS**

presenta:

**ANDREA ALICIA LÓPEZ PACHECO**

**Hermosillo, Sonora, México**

**10 de octubre de 2019**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **DERECHOS DE AUTOR**

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

---

**Andrea Alicia López Pacheco**

Autor

---

**Dra. Nohemí Gámez Meza**

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

EVALUACIÓN DEL CICLO DEL NITRÓGENO EN UN SUELO AGRÍCOLA  
PERTURBADO CON COMPUESTOS M-SALFEN DE NÍQUEL Y ZINC

T E S I S

que para obtener el grado de:  
MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

ANDREA ALICIA LÓPEZ PACHECO

Hermosillo, Sonora, México.

Octubre 2019



## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Evaluación del ciclo del nitrógeno en un suelo agrícola perturbado con compuestos M-salfen de níquel y zinc” presentada por Andrea Alicia López Pacheco, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Biociencias.

**Dra. Kadiya del Carmen Calderón  
Alvarado**  
Directora y Presidente

**Dr. Alejandro Varela Romero**  
Co-Director

**Dra. Ángela Corina Hayano  
Kanashiro**  
Sinodal interno y Secretario

**Dra. Martha Verónica Escárcega  
Bobadilla**  
Sinodal Externo

## DEDICATORIA

*A mis padres y hermanos*

*A mi sobrina Ana*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (637593) y por el gran esfuerzo en impulsar el desarrollo científico en México, apoyando a muchos otros estudiantes como yo.

Se agradece al proyecto USO313002924, a la Universidad de Sonora, así como al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) y al Posgrado en Biociencias, por otorgarme la oportunidad de desarrollar la presente investigación en sus instalaciones, las cuales son como una segunda casa para mí.

A la Dra. Kadiya del Carmen Calderón Alvarado por dirigir el presente estudio y al Dr. Ramiro Vilchez Vargas.

A la Dra. Martha Escárcega Bobadilla, quien otorgó la base fundamental en la que yace esta investigación y por la inspiración otorgada que implica su presencia.

A la Dra. Nohemí Gámez Meza, al Dr. Alejandro Varela Romero y a la Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro, por sus observaciones, recomendaciones, respeto y apoyo a los estudiantes, durante el proceso de enseñanza.

A Marielena Clark, Estefania Garibay y Milagros Álvarez, quienes con una sonrisa, me brindaron su apoyo y ayuda invaluable.

A mis compañeros de posgrado.

A mi novio, Oscar Sanders, por su amor.

Por último, pero no menos importante, a mi padre, quien es mi fortaleza e inspiración para investigar, y a mi madre, quien me recuerda que el sol no se apaga con un eclipse. No me alcanzará la vida para agradecerles todo lo que me han brindado.

## RESUMEN

El suelo proporciona servicios ecosistémicos fundamentales como la regulación del ciclo del nitrógeno, el cual es dirigido por la microbiota que éste alberga y depende la estabilidad del ecosistema ante perturbaciones como la contaminación por metales. Altas concentraciones de níquel (Ni) y zinc (Zn) en suelos agrícolas se relacionan con la aplicación de prácticas de agricultura convencionales, así como la introducción de agua contaminada proveniente de la industria minera y termoeléctrica, principalmente. Con el objetivo de conocer los efectos de dicha contaminación, se realizó un estudio en microcosmos con suelo agrícola proveniente de la Costa de Hermosillo, Sonora, México, perturbado con compuestos M-salfen de  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , para evaluar su efecto en el funcionamiento del sistema basado en el ciclo del nitrógeno a lo largo del tiempo. Análisis espectrofotométricos de la reserva de nitrógeno inorgánico, absorción atómica y pH revelaron la recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno a 240 días posteriores a las perturbaciones con compuestos de tipo M-salfen, sugiriendo la utilización de ZnSB50 y NiSB30, para controlar niveles tóxicos de amonio en el suelo y NiSB15 como promotor al incremento de la concentración de nitrato a los 60 días. Además, los compuestos tipo M-salfen podrían aplicarse en técnicas de biorremediación en suelos contaminados.



## **ABSTRACT**

The soil provides fundamental ecosystem services such as the regulation of the nitrogen cycle, which is driven by the soil microbiota in which depends the stability of the ecosystem towards abiotic disturbances such as metal pollution. High concentrations of nickel (Ni) and zinc (Zn) in agricultural soils are related to the application of conventional farming practices, as well as the introduction of contaminated water from the mining and thermoelectric industry, mainly. In order to know the effects of such contamination, a microcosm study with agricultural soil from the Coast of Hermosillo, Sonora, Mexico, disturbed with M-salphen compounds of Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, was carried out to evaluate its effect on the functionality of the system based on the nitrogen cycle over time. Spectrophotometric analyzes of the inorganic nitrogen pool, atomic absorption and pH revealed the recovery of the nitrogen cycle functionality 240 days after the disturbances with M-salphen compounds, suggesting the use of ZnSB50 and NiSB30, to control toxic levels of ammonium in the soil and NiSB15 as a promoter to increase the concentration of nitrate at 60 days. In addition, M-salphen compounds could be applied in bioremediation techniques in contaminated soils.

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
APROBACIÓN.....	<i>i</i>
DEDICATORIA.....	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS.....	<i>iii</i>
RESUMEN.....	<i>iv</i>
ABSTRACT.....	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS.....	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES.....	3
I.1 El suelo.....	3
I.2 El ciclo del nitrógeno y microorganismos que lo llevan a cabo.....	6
I.2.1 Importancia del estudio del ciclo del nitrógeno.....	13
I.3 El gen ARNr 16S para el estudio taxonómico de la diversidad microbiana del suelo.....	16
I.4 Perturbación del suelo por efectos abióticos y su efecto en la estabilidad de la comunidad microbiana.....	16
I.4.1 Perturbaciones abióticas provocadas por la contaminación con metales pesados en el suelo.....	20
I.5 Contaminación con metales en suelos de Sonora, México.....	25
I.6 Movilización y biodisponibilidad de metales pesados en el suelo....	27
I.7 Compuestos tipo M-salfen y sus usos .....	30
II. HIPÓTESIS.....	35
III. OBJETIVOS.....	36
III.1 Objetivo general.....	36
III.2 Objetivos específicos.....	36
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37

IV.1 Muestreo de suelo y diseño experimental.....	37
IV.2 Determinación del tamaño y textura de las partículas del suelo.....	39
IV.3 Determinación de la reserva de nitrógeno inorgánico.....	40
IV.4 Determinación del pH.....	40
IV.5 Determinación de la humedad del suelo.....	41
IV.6 Generación de la librería de productos de PCR para su posterior análisis de la diversidad bacteriana presente.....	42
IV.6.1 Extracción de ADN de suelo.....	42
IV.6.2 Construcción de la librería de genes.....	43
IV.7 Análisis estadístico.....	45
V. RESULTADOS.....	46
V.1 Textura del suelo.....	46
V.2 Funcionalidad del ciclo del nitrógeno y movilización de níquel y zinc.....	47
V.3 Recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno.....	53
V.4 Construcción de la librería de genes.....	54
VI. DISCUSIÓN.....	56
VI.1 Funcionalidad del ciclo del nitrógeno y movilización de níquel y zinc.....	56
VI.2 Recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno.....	63
VI.3 Librería de genes.....	64
VII. CONCLUSIONES.....	66
VIII. RECOMENDACIONES.....	67
IX. LITERATURA CITADA.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Horizontes del suelo e interacciones microbianas.....	5
2	El ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	9
3	Efectos de perturbaciones sobre la estabilidad de la comunidad microbiana (diversidad, estructura y funcionalidad) del suelo....	19
4	Fuentes de contaminación con metales y sus efectos tóxicos.....	22
5	Procesos que contribuyen a la captación microbiana de compuestos metálicos.....	28
6	Estructura general de un compuesto tipo M-salfen con geometría cuadrada en torno al centro metálico.....	31
7	Representación esquemática de diferentes configuraciones geométricas de apilamientos $\pi$ - $\pi$ entre anillos aromáticos.....	32
8	Sitio de muestreo de suelo.....	37
9	Compuestos M-salfen de níquel y zinc.....	38
10	Análisis de componentes principales de tratamientos con M-salfen de níquel y zinc incluyendo control, durante el tiempo....	47
11	Respuesta de la reserva de nitrógeno inorgánico y pH en los tratamientos con M-salfen de níquel y zinc, incluyendo control..	48
12	Reserva de nitrógeno inorgánico.....	50
13	Nitrificación en tratamientos con relación a cambios de pH, en el tiempo.....	51
14	Movilización de níquel y zinc bajo la perturbación con M-salfen.....	52
15	Efectos de M-salfen sobre la recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno.....	53
16	Construcción de la librería de genes.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Vías del ciclo del nitrógeno y sus microorganismos más representativos.....	8
2	Compuestos nitrogenados con gran impacto ambiental.....	15
3	Factores que influyen en la movilización de metales en el suelo..	29
4	Descripción química de compuestos M-salfen utilizados.....	39
5	Criterios de evaluación de un suelo de acuerdo a su pH.....	41
6	Análisis granulométrico de suelo.....	46

## INTRODUCCIÓN

Los suelos son la base de todos los ecosistemas terrestres y albergan una gran biodiversidad, la cual se autosustenta mediante el entrelazado de toda una cadena trófica que yace básicamente en el intercambio de nutrientes y a su vez, nos proporciona servicios ecosistémicos (SE) fundamentales (Aislabie y Deslippe, 2013). La actividad antropogénica ligada a la industrialización y urbanización han generado gran cantidad de desechos que son incorporados al suelo, ocasionando la modificación de procesos naturales (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2011; SEMARNAT, 2013), entre los cuales se encuentran los SE, tales como la regulación de los ciclos biogeoquímicos, como el ciclo del nitrógeno, que es de gran importancia ecológica y económica, ya que su buen funcionamiento se traduce en una eficiente disponibilidad de nutrientes para los organismos que viven en el suelo, y por lo tanto, se refleja en la producción agrícola (Philippot *et al.*, 2013). Estos ciclos biogeoquímicos son dirigidos por la comunidad microbiana en el suelo y la introducción de contaminantes pueden modificar la diversidad y estructura de la comunidad, dependiendo de la resistencia y resiliencia que la red de microorganismos presente ante tal perturbación (Shade *et al.*, 2012). Tomando en cuenta que la diversidad funcional del suelo es crítica para el funcionamiento del ecosistema (van der Putten y Wall, 2018), su funcionalidad puede verse afectada por la introducción de contaminantes en el suelo.

Una gran proporción de los contaminantes que se introducen al suelo se compone de metales pesados, los cuales se pueden definir como metales o metaloides que tienen densidades  $\geq 5 \text{ g cm}^{-3}$  y pueden encontrarse naturalmente en el suelo o añadidos por actividad antropogénica (Oves *et al.*, 2016); dentro de los metales con mayor prevalencia son el níquel y el zinc (He *et al.*, 2005; Olaniran *et al.*, 2013; Taghipour *et al.*, 2012), encontrándose ya sea adsorbidos en las partículas del suelo (no biodisponibles) o en solución (biodisponibles); cabe mencionar que también son elementos traza en una gran cantidad de ambientes y la escasa o excesiva concentración de éstos, puede afectar el desarrollo normal de las células que los requieren (Ardestani *et al.*, 2014; Cañizares-Villanueva, 2000; He *et al.*, 2005). En estudios previos se ha demostrado que con el fin de aumentar la biodisponibilidad de los metales y así, propiciar el

intercambio adecuado de nutrientes en el ecosistema, se añaden compuestos quelantes que captan todo ión metálico que se encuentre en disolución (Manouchehri y Bermond, 2009) aumentando así, la tasa de asimilación de nutrientes que toman los microorganismos para llevar a cabo reacciones enzimáticas (Oves *et al.*, 2016; Dzhardimalieva y Uflyand, 2016) como las de oxidación y reducción del nitrógeno atmosférico.

Algunos quelantes, tales como los compuestos tipo salfen, se consideran una clase muy importante de estructuras químicas orgánicas con amplias aplicaciones en aspectos biológicos, señalización de proteínas, como pigmentos visuales para el reconocimiento celular, en reacciones de aldolización enzimática y, una vez complejados, en reacciones catalíticas (Escárcega-Bobadilla *et al.*, 2013). Éste tipo de ligandos es capaz de coordinar iones metálicos a través de la cavidad dióxido de dinitrógeno ( $N_2O_2$ ) que contiene, confiriéndole la capacidad de estabilizar muchos metales en diversos estados de oxidación, que controlan su rendimiento en una gran variedad de transformaciones catalíticas útiles (Bader, 2010; Gupta y Sutar, 2008), soportando varios ciclos de oxidación-reducción. Una vez que el metal es coordinado con un compuesto salfen, podría aumentarse su solubilidad en la matriz del suelo, debido a la naturaleza de la estructura del ligando que, en este caso contiene grupos hidroxilo, cuyos oxígenos pueden formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua ( $H_2O$ ) (Sadava *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que los compuestos tipo salfen que contienen  $N_2O_2$ , presentan actividad intercalante al ácido desoxiribonucleico (ADN) (Jafarian *et al.*, 2012; Rebouças *et al.*, 2008).

Cuando el metal coordinado es introducido en la célula microbiana, puede participar en actividades como: (1) la conformación de la estructura de proteínas y pigmentos, (2) procesos de oxidación-reducción, (3) la regulación de la presión osmótica dentro de la célula manteniendo el balance iónico y (4) en la actuación como componentes enzimáticos dentro del metabolismo de los organismos que los incorporan (Kosolapov *et al.*, 2004; Zaidi *et al.*, 2011), pudiendo afectar de esta manera el ciclo natural de nutrientes que los microorganismos llevan a cabo. Por todo lo anterior, el presente estudio evaluó los efectos que provoca la perturbación con compuestos M-salfen de níquel y zinc, como acarreadores de dichos iones metálicos, sobre la comunidad microbiana de un suelo agrícola en relación con su funcionamiento basado en el ciclo del nitrógeno.

## **I. ANTECEDENTES**

La actividad antropogénica, entre las cuales se encuentra la minería, que introduce desechos tóxicos al suelo como subproducto de la explotación de yacimientos minerales (de la O-Villanueva *et al.*, 2013; Puga *et al.*, 2006) y la agricultura intensiva que utiliza grandes cantidades de suministros para sustentarse, como fertilizantes, pesticidas, labranza y capital (Sandhu *et al.*, 2010), ha hecho posible una vasta producción de materias primas y alimentos para abastecer la actual demanda global (Smil, 2000); sin embargo, éstas prácticas han provocado la degradación del suelo, causando principalmente la pérdida de su productividad (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2011), ocasionando daños ambientales y la degradación de los SE (Tilman, 2001; Calderón *et al.*, 2017). Los SE presentes en sistemas terrestres incluyen procesos como el control biológico de plagas, malezas y enfermedades, la polinización de cultivos, prevención de la erosión del suelo y la regulación de ciclos biogeoquímicos, como el ciclo del carbono y nitrógeno por parte de microorganismos y plantas que yacen en éste (Aislabie y Deslippe, 2013; Birgé *et al.*, 2016; Brevik *et al.*, 2015; Dominati, 2013; Dominati *et al.*, 2010; van der Putten y Wall, 2018).

Los SE mencionados, aseguran la estabilidad del ecosistema ante perturbaciones bióticas o abióticas, además de proporcionarnos bienes como legumbres, forraje y biocombustibles (Calderón *et al.*, 2018; Whalen, 2014). A pesar de lo anterior, dichos servicios son afectados a una velocidad alarmante lo cual compromete a un estado crítico en la calidad de vida y la sustentabilidad de la economía global (Birgé *et al.*, 2016; Sandhu *et al.*, 2010).

### **I.1 El suelo**

La definición de suelo es muy amplia; desde una visión geotécnica, se define como el material sin consolidar que se encuentra sobre el lecho rocoso, desde el punto de vista biológico, constituye la capa de material fértil que recubre la superficie de la Tierra explotada por las raíces de las plantas y organismos que obtienen sostén, nutrimentos y agua (SEMARNAT, 2013), considerándose como uno de los mayores reservorios de biodiversidad del planeta Tierra

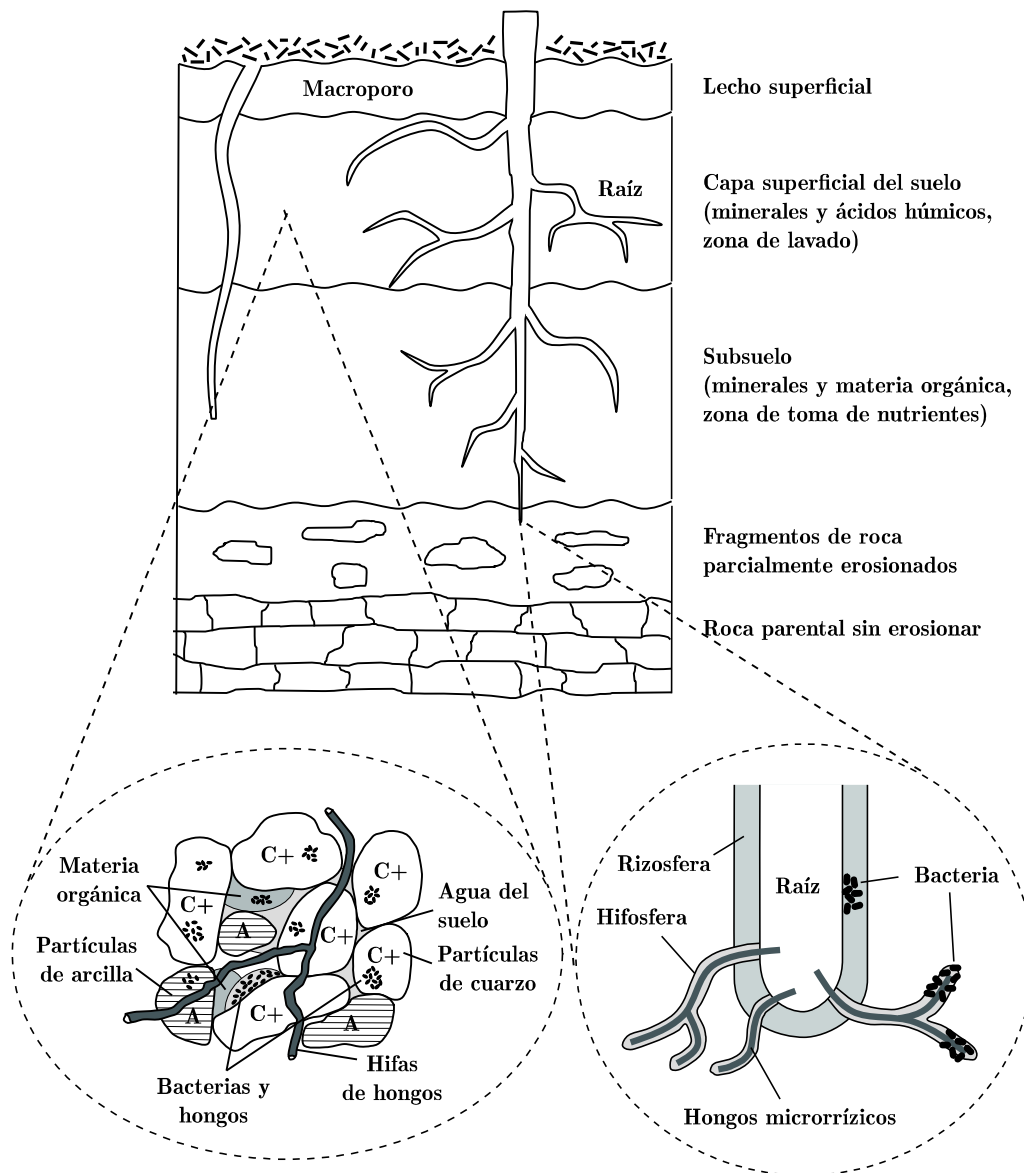


(Calderón *et al.*, 2017). Desde una perspectiva ambiental, el suelo nos proporciona diversos SE como son: la regulación de los ciclos biogeoquímicos y amortiguamiento de los efectos ocasionados por contaminantes, así como el control de plagas y enfermedades (SEMARNAT, 2013; Doran y Zeiss, 2000). Bajo una perspectiva funcional, el suelo, se puede definir como: (1) la base física para obras de construcción, viviendas e instalaciones técnicas (2) como filtro y amortiguador, permitiendo el flujo de agua subterránea y su limpieza (3) como fuente de materiales valiosos, incluidos los minerales (4) como un medio de fertilidad suficiente para permitir la producción agrícola y (5) como lugar donde se realizan funciones ecológicas relevantes para la biosfera en general, tales como la regulación de ciclos biogeoquímicos (van Straalen, 2002). Todo lo anterior se lleva a cabo gracias a la eficiente interacción entre el componente biótico y abiótico que lo constituye.

El componente biótico o humus es la materia de color oscuro formada por materia orgánica y microorganismos, mientras que el componente abiótico o partículas minerales se constituye por arenas, limos y arcillas, cuya cantidad relativa determina el tipo de biota que se desarrolla (FAO, 2009), lo cual conforma la matriz en la que yacen los organismos que viven en ella; esta matriz consiste en partículas sólidas, agregados de partículas de suelo y volúmenes abiertos llenos de aire y/o agua, llamados espacios porosos (Figura 1). El espacio poroso del suelo es importante para el crecimiento de las raíces, el movimiento y almacenamiento de agua y para el movimiento de gases dentro del sistema. Los suelos interactúan con el aire gracias a estos poros, a través de un transporte de difusión (principalmente), intercambiando el aire del espacio poroso del suelo superficial con el aire que se encuentra sobre la superficie del suelo. Los poros del suelo superior interactúan con los espacios porosos de las capas inferiores, lo que lleva a un movimiento general del material a lo largo de la columna de éste (Redeker *et al.*, 2015).

El intercambio de gases entre la atmósfera y el suelo, permite que los organismos dentro de la matriz, interactúen con el aire que los recubre, ya sea a través de la entrega de un exceso de subproductos metabólicos de los organismos a la atmósfera (p. ej. la expulsión de  $\text{NH}_3$  que ocasiona la lluvia ácida) (Behera *et al.*, 2013) ó mediante el consumo de los compuestos químicos suministrados a través del aire atmosférico (p. ej. el consumo de  $\text{CH}_4$  en suelos de bosques aeróbicos o emisión de  $\text{NO}_2$ ). Ésta combinación químicamente compleja de flujo de

salida (suelo a atmósfera) y afluencia (de atmósfera a suelo) de compuestos volátiles se ha denominado "volatiloma del suelo" y se ha propuesto como una herramienta para estudiar la salud de éste y las comunidades microbianas que se encuentran implicadas (Insam y Seewald, 2010; Schmidt *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Horizontes del suelo e interacciones microbianas. Modificado de Aislabie y Deslippe (2013).

En los últimos años, se ha hecho evidente que los compuestos volátiles microbianos pueden desempeñar dos funciones principales en las interacciones a larga distancia dentro de las comunidades microbianas del suelo: (1) como moléculas infoquímicas que afectan el comportamiento, la dinámica de la población y la expresión de genes en los microorganismos que responden y (2) como herramientas de competencia de interferencia que suprimen o eliminan enemigos potenciales (Schmidt *et al.*, 2016). Por lo general, los organismos que llevan a cabo funciones específicas como la regulación de ciclos biogeoquímicos, representan grupos funcionales cuya presencia o ausencia afecta directamente a las tasas de flujo de nutrientes dentro del suelo (Allison y Martiny, 2008). Por lo anterior, es importante evaluar cuantitativamente, qué funciones comparten con otras especies y su papel dentro de toda la biodiversidad presente en el ecosistema, con el fin de conocer la estabilidad microbiana estudiada desde tres componentes de la respuesta a la perturbación, los cuales son: (1) la diversidad microbiana, (2) la estructura de la comunidad y (3) la función microbiana (por ejemplo, regulación de ciclos biogeoquímicos y actividades enzimáticas) (Azarbad *et al.*, 2016).

## **I.2 El ciclo del nitrógeno y microorganismos que lo llevan a cabo**

El nitrógeno (N) fue descubierto por Daniel Rutherford en 1772, es un elemento no metálico que se encuentra dentro del grupo 15 en la tabla periódica de los elementos y su estado físico a 20° C (68° F) es en forma de gas diatómico (N<sub>2</sub>) comprendiendo el sexto elemento más abundante en el cosmos (Goldberg, 2013), ocupa el 78% del volumen de la atmosfera terrestre, aproximadamente (Hirsch y Mauchline, 2015) y se pueden encontrar sus derivados principalmente en forma de amoníaco (NH<sub>3</sub>), sales de amonio (NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, etc), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) y ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (Goldberg, 2013). Químicamente, el nitrógeno molecular o dinitrógeno (N<sub>2</sub>) está formado por tres enlaces covalentes entre dos átomos de nitrógeno (N), conteniendo un par de electrones libres en cada uno de éstos, disponibles para enlazarse y formar compuestos orgánicos e inorgánicos, confiriéndole numerosas aplicaciones catalíticas y bioquímicas al elemento (Tarselli, 2012). Dentro de los organismos, conforma el 15% de su peso seco, molecularmente se encuentra en proteínas estructurales, enzimas, ácidos

nucleicos (ARN y ADN) y componentes celulares, conformando la reserva de nitrógeno orgánico disuelto.

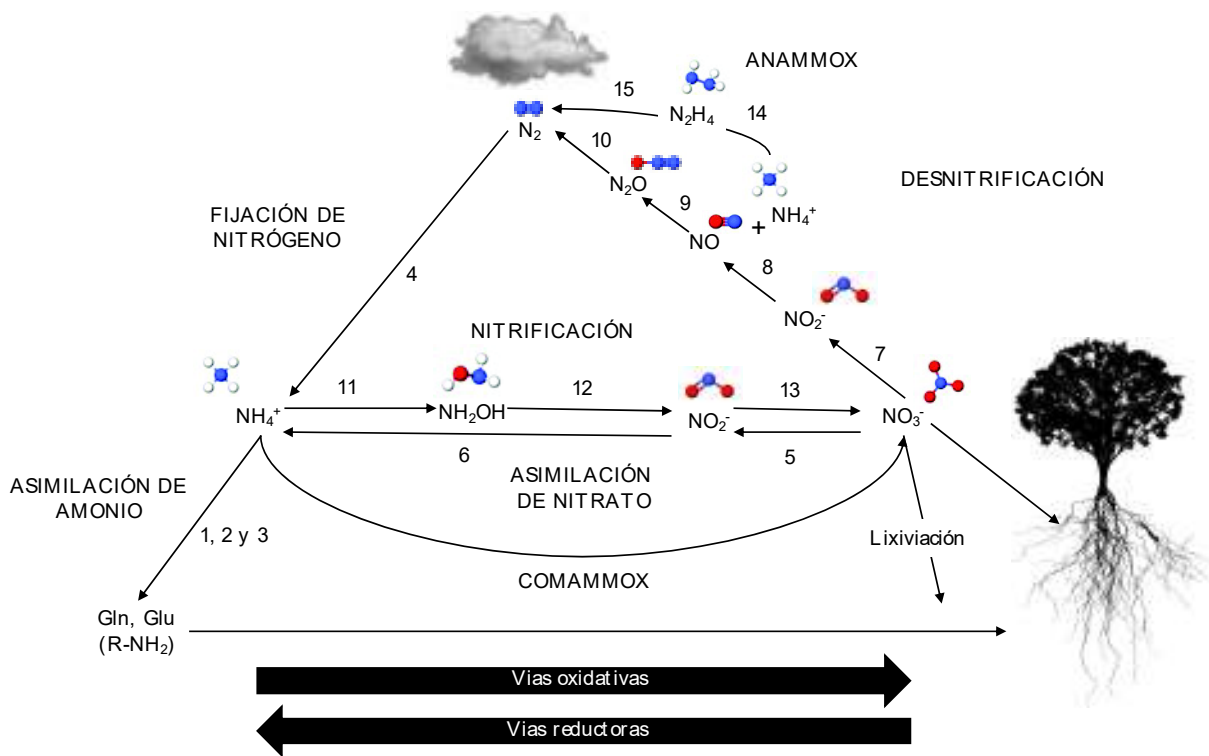
La prevalencia de nitrógeno en la materia viva implica que grandes cantidades de nitrógeno sea devuelto al ambiente, cuando los organismos mueren. En éste punto, el nitrógeno orgánico es degradado por microorganismos mediante el proceso de mineralización que lo convierte a compuestos simples de nitrógeno (Jorgensen, 2009) pudiendo ser utilizado para crear nuevo material celular por otros organismos. Por otro lado, la introducción de nitrógeno al suelo, se puede dar mediante la fijación de  $N_2$  atmosférico, el cual es reducido a amonio ( $NH_4^+$ ), que después es oxidado a nitrito ( $NO_2^-$ ) y después nuevamente oxidado a nitrato ( $NO_3^-$ ) (Hirsch *et al.*, 2015; Isobe y Ohte, 2014; Rosswall, 1982; Ward y Jensen, 2014), estos tres compuestos conforman la reserva de nitrógeno inorgánico (RNI) en el suelo y su conversión conforma un proceso beneficioso para los organismos que no fijan el  $N_2$  y lo necesitan para subsistir.

Los organismos no fijadores de  $N_2$  sólo pueden asimilar y beneficiarse de las propiedades del elemento, gracias a la actividad de microorganismos fijadores de  $N_2$  que lo asimilan transformándolo en compuestos orgánicos (Stein y Klotz, 2016). La cantidad de nitrógeno a menudo es limitado a la producción en sistemas terrestres y acuáticos debido a su versátil química redox y por ser un elemento esencial para los organismos (Cabello *et al.*, 2004), conforma la base de transformaciones biogeoquímicas complejas que controlan el inventario de N biológicamente disponible en el medio ambiente (Ward *et al.*, 2014). El nitrógeno puede encontrarse en varios estados de oxidación, desde  $5^+$  en el compuesto más oxidado: el nitrato ( $NO_3^-$ ), hasta  $3^-$ , en la forma más reducida, el amoníaco ( $NH_3$ ), y en compuestos biológicos está casi exclusivamente presente en el estado completamente reducido (Cabello *et al.*, 2004); por lo cual es de gran importancia estudiar el funcionamiento del ciclo del nitrógeno como indicador de la funcionalidad de la comunidad microbiana que lo lleva a cabo (Tabla 1).

**Tabla 1.** Vías del ciclo del nitrógeno y sus microorganismos mas representativos. Información obtenida de Isobe *et al.* (2014).

<b>Microorganismos</b>	<b>Géneros</b>
Fijadores de nitrógeno	<i>Azotobacter</i> (Gammaproteobacteria), <i>Bradyrhizobium</i> (Alphaproteobacteria), <i>Nostoc</i> (cianobacteria), <i>Anabaena</i> (cianobacteria), <i>Trichodesmium</i> (cianobacteria), <i>Pseudomonas</i> (Gammaproteobacteria), <i>Methylomonas</i> (Gammaproteobacteria), <i>Alcaligenes</i> (Betaproteobacteria), <i>Thiobacillus</i> (Betaproteobacteria), <i>Methanosarcina</i> (Arquea), <i>Methanococcus</i> (Arquea), <i>Chromatium</i> (Gammaproteobacteri), <i>Chlorobium</i> , <i>Desulfovibrio</i> (Deltaproteobacteri), <i>Clostridium</i> , <i>Rhizobium</i> (Alphaproteobacteria), <i>Frankia</i> (Actinobacteria)
Oxidadores de amonio (AOB, AOA y Anammox)	Bacterias aerobias: <i>Nitrosomonas</i> (Betaproteobacteria), <i>Nitrospira</i> (Betaproteobacteria) <i>Nitrosococcus</i> (Gammaproteobacteria). Bacterias anaerobias (Anammox): <i>Candidatus</i> (Gammaproteobacteria) <i>Brocadia</i> , <i>Kuenenia</i> (Planctomycetia), <i>Anammoxoglobus</i> (Planctomycetia), <i>Jettenia</i> (Planctomycetia) y <i>Scalindua</i> (Planctomycetia). Arqueas aerobias: <i>Candidatus Nitrososphaera viennensis</i> , <i>Candidatus Nitrososphaera gargensis</i> , <i>Candidatus Nitrosotalea devanattera</i>
Oxidadores de nitrito (NOB)	<i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrotoga</i> y <i>Nitrococcus</i> dentro de Alfa-, Beta-, y Gamma- proteobacteria, respectivamente y <i>Nitrospira</i> dentro de <i>Nitrospirae</i> y <i>Nitrospina</i> . Comammox: <i>Nitrospira</i> linaje II
Desnitrificantes heterotróficos	<i>Pseudomonas spp</i> (Gammaproteobacteria), <i>Azospirillum spp</i> (Alfaproteobacteria).

El ciclo del nitrógeno permite que las interconversiones de los compuestos nitrogenados mantengan una cantidad relativamente pequeña de nitrógeno fijo o combinado en un intercambio continuo con dinitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), un enorme depósito de nitrógeno. Dicho ciclo incluye procesos reductivos y oxidativos, en los que organismos procariontes desempeñan un papel predominante gracias al acervo enzimático que emplean para llevar a cabo las etapas del proceso (Cabello *et al.*, 2004) (Figura 2).



**Figura 2.** El ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Los diferentes compuestos de nitrógeno se organizan de acuerdo con sus estados de oxidación y las principales vías reductoras u oxidativas se indican mediante flechas. Las enzimas involucradas en las diferentes vías son: 1–2, glutamina sintetasa – glutamato sintasa (GS – GOGAT); 3, glutamato deshidrogenasa (GDH); 4, nitrogenasa; 5, nitrato reductasa asimilatoria (*Nas*); 6, reductasa de asimilación de nitrito (sirohaem-Nir); 7, reductasas de nitrato disimilatorias y respiratorias (*Nap* y *Nar*); 8, reductasas de nitrito respiratorio (Cu-Nir y cd1-Nir); 9, reductasa de óxido nítrico (*Nor*); 10, reductasa de óxido nitroso (*Nos*); 11, amoniaco monooxigenasa; 12, hidroxilamina oxidasa; 13, nitrito oxidasa; 14, hidracina hidrolasa; 15, hidracina oxidasa (HZO). Modificado de Cabello *et al.* (2004).

La primera etapa del ciclo del nitrógeno consiste en la asimilación de nitrógeno y de nitratos, en el cual se genera amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) que se incorpora mayormente en el material celular. La fijación de  $\text{N}_2$  sólo es impulsada por procariontas diazotróficos de vida libre o simbióticos que codifican para enzimas nitrogenasas comprendidas por la proteína dinitrogenasa de molibdeno-hierro y la proteína reductasa de vanadio o hierro dinitrogenasa (Figura 2, reacción 4), constituyendo un proceso extremadamente sensible al oxígeno y requiere que los microorganismos desarrollen mecanismos de protección, como el desacoplamiento espacial (compartimentación o formación de células especializadas), desacoplamiento temporal, respiración rápida de  $\text{O}_2$ , o la maximización de síntesis y uso de la nitrogenasa. El amonio producido por la fijación de nitrógeno se asimila a la biomasa por la ruta de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT) (Figura 2, reacción 1,2 y 3), o respirado por microorganismos aerobios y anaerobios que oxidan el amoniaco. Cabe mencionar, que puede generarse un acoplamiento de la reducción de amonio, la subsiguiente oxidación de amonio a nitrito (con la enzima hidroxilamida) para ser oxidado nuevamente éste último a nitrato (llevado a cabo por bacterias quemolitoautótroficas con enzimas nitrito oxidasas), en bacterias metanotróficas nitrificantes activas que se encuentran en comunidad o dentro de células individuales, como en las células vegetales de las raíces, donde fijan el nitrógeno y realizan todo el proceso en el mismo lugar (Isobe y Ohte, 2014; Stein *et al.*, 2016).

Por otro lado, existe la asimilación anaerobia de nitrito (ANRA, por sus siglas en inglés) y la reducción de nitrito disimilatorio (DNRA, por sus siglas en inglés) a  $\text{NH}_4^+$ , lo cual comprende una segunda versión de la amonificación y se realiza tanto por bacterias como por hongos. Éste proceso se puede vincular a la reducción de nitrato a nitrito, a nivel celular o entre organismos en una comunidad. El acrónimo DNRA se acuñó originalmente para describir un proceso ecofisiológico en el que el nitrógeno en forma de  $\text{NO}_3^-$  se eliminaba de forma rastreable de los suelos sin que se perdiera en forma de gases nitrogenados (desnitrificación) o se asimilara a la biomasa microbiana. Si bien no se conoce bien la importancia de ANRA y DNRA para el ciclo global del  $\text{NO}_2$  facilitado por la fermentación de hongos en los suelos, la amonificación respiratoria por bacterias y arqueas en diversos hábitats anóxicos está bien establecida. DNRA puede generar una fuerza protonomotriz celular y, por lo tanto, conservar energía para apoyar el crecimiento celular, aunque esta característica depende de qué enzimas se acoplan; un

potencial redox negativo (es decir, condiciones reductoras) es el estimulante más importante para DNRA. Cabe señalar que el proceso ANRA emplea una química idéntica a la DNRA, pero se ve facilitado por las reductasas de nitrito evolutivamente no relacionadas (Isobe y Ohte, 2014; Stein *et al.*, 2016)

Después de la fijación de nitrógeno atmosférico, se lleva a cabo el proceso de nitrificación que implica tres grupos de microorganismos: grupo I, oxidantes de amoníaco que oxidan el amoníaco a nitrito (nitritación; Figura 2, reacciones 11 y 12) que ocurre mayormente en suelos ácidos (pH <5.5) (Isobe *et al.*, 2014); grupo II, oxidantes de nitritos que oxidan nitrito a nitrato (nitratación; Figura 2, reacción 13); y el grupo III, oxidantes completos de amoníaco que oxidan éste compuesto en todo el proceso hasta formar nitratos, sin expeler nitrito al medio (comammox; Figura 2, reacciones 11, 12 y 13), microorganismos que se describieron hasta el 2015, después de 10 años de ser descubiertos (Isobe *et al.*, 2014). Los grupos II y III incluyen sólo microorganismos quimiolitotróficos que pueden usar nitrito y amoníaco, respectivamente, como fuentes únicas de energía y reductor para el crecimiento celular. Mientras que las quimiolitótrofas oxidantes de nitrito del grupo II están clasificadas dentro de varias clases de Proteobacteria y el filo Nitrospirae, las bacterias llamadas Comammox están, hasta ahora, restringidas a representantes en el linaje II del género *Nitrospira* (Daims *et al.*, 2015). Los oxidantes de amoníaco nitrificantes del grupo I, incluyen miembros quimiolitotróficos de Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria y, miembros de *Thaumarchaeota*. Además de estos quimiolitótrofos, existen microorganismos heterotróficos y metanótrofos que oxidan profusamente el amonio al nitrito, pero no obtienen energía del proceso para apoyar el crecimiento, siendo la tasa de oxidación del amonio frecuentemente más influenciada por cambios ambientales y perturbaciones que la tasa de mineralización, lo cual resulta en una marcada disminución en su diversidad filogenética (Isobe *et al.*, 2014). Por otro lado, el nitrito y el nitrato producidos por reacciones aeróbicas en el proceso de nitrificación pueden respirarse anaeróbicamente (Figura 2, reacciones 5 y 6) o el amonio resultante puede ser asimilado (Isobe *et al.*, 2014; Stein *et al.*, 2016).

Con el fin de mantener el balance entre entrada y salida de nutrientes entre el suelo y la atmósfera, se lleva a cabo la desnitrificación, la cual describe el proceso de respiración anaeróbica del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico (NO), y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a  $\text{N}_2$  (Figura 2,



reacciones 8, 9 y 10) por los microorganismos heterótrofos que pueden acoplar directamente éstas tres reacciones con la reducción de nitrato a nitrito (Figura 2, reacción 7) y realizar la desnitrificación del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  los cuales se denominan descriptores clásicos o canónicos. No obstante, se reconoce que muchas bacterias y arqueas expresan sólo un inventario genético de desnitrificación parcial, faltándoles genes que codifican enzimas involucradas en las reacciones 7, 9 y/o 10 (Figura 2). Dichas vías incompletas pueden conducir a la liberación de gases nitrogenados como el NO y el  $\text{N}_2\text{O}$  al medio ambiente, o a una falla para agotar  $\text{NO}_3^-$ ; por ejemplo, el primer análisis del genoma de *Agrobacterium tumefaciens* reveló que algunas bacterias desnitrificantes carecen del gen Nos, que codifica la enzima reductasa de  $\text{N}_2\text{O}$  y cataliza su reducción a  $\text{N}_2$  (Wood *et al.*, 2001)

Los microorganismos desnitrificantes también incluyen todas las bacterias quimiolitotróficas oxidantes del amoníaco, que reducen el  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$  aeróticamente (Figura 2, reacciones 8 y 9). Además, varios eucariotas, incluyendo hongos y foraminíferos (una clase de protistas) puede reducir  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{N}_2$ , respectivamente. En un giro inusual al proceso de desnitrificación, una bacteria metanotrófica, *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*, consume metano como fuente reductora de energía y carbono, y reduce el  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2$  expresando una enzima óxido nítrico dismutasa. Esta enzima dismuta dos moléculas de NO a  $\text{O}_2$  y  $\text{N}_2$  sin producir el intermedio  $\text{N}_2\text{O}$  (Figura 2, reacción 8, 9 y 10) (Isobe *et al.*, 2014; Stein *et al.*, 2016).

Recientemente se han identificado otras vías alternativas del ciclo del nitrógeno, tal es el caso de la vía anammox u oxidación anaerobia del amonio, que utiliza las reservas de  $\text{NO}_2^-$  y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) para formar  $\text{N}_2$  a través de los intermedios NO y la hidracina ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) (Figura 2, reacciones 14 y 15). Las principales rutas de anammox incluyen la reducción de nitrito a óxido nítrico (NO) por la enzima nitrito reductasa, la conversión de NO y amonio a hidracina por hidracina hidrolasa (única en bacterias anammox), la oxidación de hidracina a  $\text{N}_2$  por una enzima oxidante de hidracina (HZO) y la subsiguiente síntesis de ATP por una ATP sintasa utilizando la fuerza motriz de protones generada durante el ciclo anammox. Los mecanismos que controlan la reducción de nitrito en la reacción anammox están en debate y, hasta la fecha, no hay un acuerdo común sobre si la reacción procede de NO o hidroxilamina como intermedios (Karlsson *et al.*, 2009). En la literatura reciente también se ha sugerido la existencia de una vía anammox modificada, en la que la hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) se usa en lugar de NO para la

oxidación de  $\text{NH}_4^+$ , pero se requiere mayor experimentación para validar esta vía. La quimiolitotrofia de anammox se realiza únicamente por las bacterias Brocadiaceae en el orden Planctomycetales dentro de un orgánulo especializado llamado el anammoxosoma. Anammox es ecológicamente beneficioso para el tratamiento de aguas residuales ya que elimina tanto el nitrito como el amonio simultáneamente sin producir  $\text{N}_2\text{O}$ , y ha sido implementado industrialmente a gran escala; además de comprender un proceso importante de eliminación de nitrógeno en el océano y en las zonas mínimas de oxígeno (Stein *et al.*, 2016).

### **I.2.1 Importancia del estudio del ciclo del nitrógeno**

El crecimiento de todos los organismos depende de la disponibilidad de nitrógeno reducido que se requiere en grandes cantidades como un componente esencial de proteínas y ácidos nucleicos. En consecuencia, la falta de nitrógeno biológicamente disponible es a menudo el factor limitante para el crecimiento y la producción de biomasa, incluso en ambientes donde hay un clima adecuado y agua suficiente para sustentar la vida. Aunque la atmósfera de la Tierra es una fuente abundante de nitrógeno, éste no puede ser utilizado por la mayoría de los organismos porque la energía de enlace del enlace triple entre los dos átomos de nitrógeno hace que la molécula de  $\text{N}_2$  sea muy estable. Éste problema es superado por los microorganismos que tienen un papel central en la fijación del elemento y en casi todos los demás aspectos respecto a su biodisponibilidad en el ambiente y, por lo tanto, dichos microorganismos respaldan la vida en la Tierra (Martínez-Espinosa *et al.*, 2011); por lo cual, la adquisición del nitrógeno y su ciclo tiene el potencial de estructurar comunidades microbianas, y de esta manera, repercutir en la productividad de ecosistemas determinados (Ward y Jensen, 2014).

La funcionalidad de la comunidad microbiana basada en el ciclo del nitrógeno, se puede ver afectada por la introducción de diversos contaminantes; algunos de ellos son los fertilizantes sintéticos de nitrógeno, la aplicación de composta y fertilizantes metálicos, entre otros, los cuales son utilizados generalmente con el fin de aumentar la cantidad de amonio disponible para los seres vivos en el suelo. Por otra parte, las emisiones de  $\text{CO}_2$  que se expelen al ambiente como producto de la industria, ocasionan la lixiviación del ion nitrato (que después se introduce a aguas subterráneas), así como también la generación de  $\text{N}_2\text{O}$ , un gas de invernadero producido

por las bacterias desnitrificantes en el suelo, que tienen la enzima *nosZ*. Bajo éste esquema, un buen manejo de los microorganismos implicados en el ciclo sería importante para reducir las emisiones de dicho gas, cuando las condiciones hacen inevitable la desnitrificación (Hirsch *et al.*, 2015)

Por otra parte, cuando se acelera la fijación de nitrógeno atmosférico para obtener mayor disponibilidad de amoníaco que se pueda asimilar en las plantas, éstas crecen más y aumentan su biomasa, consumiendo un mayor número de nutrientes del medio que como normalmente lo harían, ocasionando así, la erosión y desertificación del suelo, teniendo como consecuencia la disminución de la materia orgánica presente con el paso del tiempo (Hirsch *et al.*, 2015) lo cual conduce a la infertilidad de grandes extensiones de tierra. En agricultura, la conversión de fertilizante de amonio en nitrato conduce a una pérdida sustancial de nitrógeno de los suelos. En contraste, la nitrificación es beneficiosa como un paso clave en el tratamiento biológico de aguas residuales para eliminar el exceso de nitrógeno de las aguas (Daims *et al.*, 2016).

Con el crecimiento extremadamente rápido de la población y el constante uso de sustancias fertilizantes, hemos forzado el ciclo del nitrógeno más allá de la sostenibilidad, donde el aumento de  $\text{NO}_3^-$  es el responsable del incremento de zonas muertas en áreas costeras y  $\text{N}_2\text{O}$  es considerado un gas de invernadero a mitigar en el siglo XXI (Stein y Klotz, 2016). Por otro lado, Daims *et al.* (2016) mencionó que el proceso de oxidación del nitrito, llevado a cabo por bacterias NOB, ha recibido menos atención por el hecho de que éste no se acumula en muchos ecosistemas, agregando que, las bacterias implicadas son muy difíciles de cultivar en el laboratorio; sin embargo, su falta de presencia no implica que no sea importante en las reacciones llevadas a cabo. En éste sentido, los niveles de nitrito determinan si el nitrógeno permanece fijado como nitrito, nitrato o amonio o es perdido en la atmosfera como NO,  $\text{N}_2\text{O}$ , o  $\text{N}_2$ ; NOB impide la pérdida de nitrógeno en el sistema, convirtiendo el nitrito a nitrato, el cual es utilizado como fuente de nitrógeno por muchos microorganismos y plantas, además, la falta de oxidación o reducción de nitrito, causa su acumulación en casos raros, siendo tóxico para eucariotas inhibiendo el crecimiento bacteriano.

El favorecimiento de unas cuantas reacciones dentro del proceso, selecciona sólo ciertos grupos de microorganismos que los llevan a cabo, perdiéndose así, diversidad microbiana y por

lo tanto, conexiones entre organismos que pueden proporcionar resistencia o resiliencia al sistema, ante perturbaciones inesperadas que se presenten y, por consiguiente, viéndose afectado el ambiente debido al desbalance de compuestos generados (Tabla 2) (Calderón *et al.*, 2018). El control del ciclo del nitrógeno es complejo, en parte por el aparente éxito en la producción dependiente de fertilizantes, y también porque aún nos encontramos descubriendo cómo funcionan los procesos microbiológicos del ciclo del nitrógeno por lo cual, es necesario conocer cómo se comporta la comunidad microbiana implicada en el ciclo del nitrógeno, en respuesta a determinadas perturbaciones.

**Tabla 2.** Compuestos nitrogenados con gran impacto ambiental. Información obtenida de Martínez-Espinosa *et al.* (2011).

<b>Compuestos Nitrogenados</b>	<b>Impacto Ambiental</b>
NO y N <sub>2</sub> O	El N <sub>2</sub> O tiene un potencial de calentamiento global 300 veces mayor que el CO <sub>2</sub> , y su carga atmosférica aumenta un 0,25% cada año. Además, tanto N <sub>2</sub> O como NO dañan la estratósfera, donde actúan como catalizadores en la destrucción del ozono atmosférico.
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Se pueden lixiviar de los suelos y entrar en aguas subterráneas. En concentraciones de <5 mM, NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> es tóxico para la mayoría de los microorganismos. Los niveles elevados de nitrato en el agua potable son un factor de riesgo que ocasiona la metahemoglobinemia (una causa potencial del síndrome del bebé azul) y el cáncer de colon.
NH <sub>3</sub>	Actúa como un aerosol, disminuyendo la calidad del aire y adhiriéndose a las gotas de agua.
N <sub>2</sub>	Una adición excesiva de compuestos derivados del N <sub>2</sub> al medio ambiente, causa la eutrofización, lo que resulta en una pérdida de diversidad de especies y por consiguiente, la pérdida de su función.

### **I.3 El gen ARNr 16S para el estudio taxonómico de la diversidad microbiana del suelo**

Los ribosomas son una parte esencial de la maquinaria de biosíntesis de proteínas y, por lo tanto, funcionalmente se encuentran altamente conservados. Sin embargo, a pesar de esta conservación funcional, ciertas partes de la molécula de ARNr y su gen correspondiente son variables, ya que no parecen ser tan importantes para la función. Éstos sitios variables pueden servir como "relojes moleculares" para rastrear la evolución y las relaciones filogenéticas y ser utilizados en estudios taxonómicos de los organismos en general. La importancia sobresaliente de los genes ARNr para investigar la fenomenología de todas las formas de vida, como puede ser inclusive para la construcción del "árbol universal de la vida", el cual fue reconocido primeramente por Woese y Fox en 1977 (Woese y Fox, 1977) y desde entonces, se han desarrollado diversas técnicas que los utilizan, como por ejemplo para el estudio ecológico de bacterias y arqueas con el gen ARNr 16S; y para eucariotas, con el 18S, cuyo tamaño de ambos es de aproximadamente 1540 nucleótidos (Killham, 2011).

En el caso de bacterias y arqueas, se han identificado 9 regiones hipervariables (V1-V9) intercaladas con regiones conservadas en el gen ARNr 16S y se ha planteado que es suficiente la secuenciación de una sola región para la clasificación taxonómica (Illumina, 2013b); sin embargo, recientemente Fuks *et al.* (2018) han demostrado que la combinación de regiones proporciona una mejor resolución en la identificación de comunidades microbianas. La región V1 inicia en la posición nucleotídica 8 y termina en la 96, mientras que la región V2 inicia en la posición 97 y termina en la 306 (Gürsoy y Can, 2019) que juntas comprenden una secuencia de aproximadamente 297 nucleótidos, característica que permite la eficaz secuenciación en secuenciadores de siguiente generación de la marca Illumina.

### **I.4 Perturbación del suelo por efectos abióticos y su efecto en la estabilidad de la comunidad microbiana**

El término perturbación se ha convertido en una característica predominante en teoría ecológica y se utiliza para describir una gran variedad de fenómenos que causan mortalidad, desplazamiento o daño a los individuos dentro de un sistema, lo cual puede ser interpretado desde una perspectiva teórica como un evento que causa cambios temporales y localizados en

la tasa demográfica (incrementando mortalidad y/o disminuyendo crecimiento y reproducción) de una comunidad. Cabe mencionar que una perturbación no es lo mismo que estrés, el cual también puede cambiar comunidades ecológicas, pero de una manera permanente y difusa, respecto a la reconfiguración de individuos que se genera bajo factores de estrés determinantes; por ejemplo, debido a que el cambio climático tiene una naturaleza global y permanente, constituye un estrés, mientras que una tormenta es una perturbación debido a que se manifiesta en determinados momentos relativamente cortos y cada evento difiere en potencia (Dornelas, 2010). Es por esto que, las perturbaciones se clasifican como de pulso o presión dependiendo de su duración y efecto directo o indirecto en las propiedades físicas y químicas del suelo (Bender *et al.*, 1984; Shade *et al.*, 2012). Por ejemplo, las adiciones de fertilizantes orgánicos e inorgánicos son perturbaciones de pulso, que constituyen eventos relativamente discretos a corto plazo, mientras que las perturbaciones a presión, son a largo plazo o continuas, como la formación de cal (que cambia el pH del suelo) o la inundación (Lourenço *et al.*, 2018).

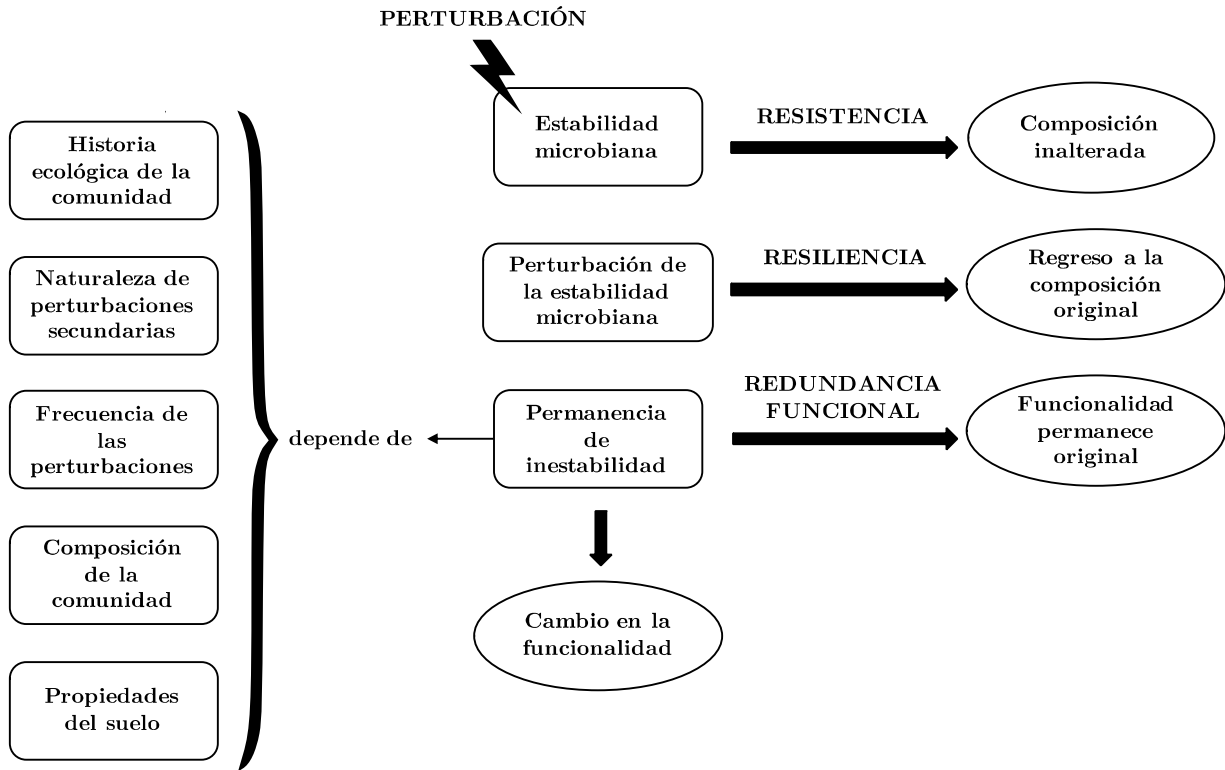
La dinámica de los ecosistemas a través del tiempo se ve influenciada por las perturbaciones a las cuales se ve sujeta, ya sea que la perturbación sea de pulso o presión. En éste sentido, recientemente Calderón *et al.* (2018) demostraron que el orden cronológico en el que se producen las perturbaciones, puede hacer que un ecosistema del suelo sea cada vez más vulnerable a perturbaciones posteriores; esto debido a los efectos heredados en la composición de la comunidad microbiana del suelo, pudiéndola afectar de forma duradera. Sus resultados indicaron que el impacto de las perturbaciones en serie sobre las propiedades y funciones del suelo, se refleja en el grado de relación filogenética entre las comunidades microbianas presentes, lo cual apoya la importancia de la composición y diversidad de la comunidad microbiana para mantener el funcionamiento del ecosistema en condiciones fluctuantes (Allison *et al.*, 2008).

Ante las condiciones fluctuantes que marcan las perturbaciones periódicas, los microorganismos del suelo pueden mostrarse resistentes o resilientes y, si efectivamente resultan sensibles ante tal evento, pueden funcionar de manera diferente o no modificar significativamente su función, a lo que se dice ser funcionalmente redundantes. La resistencia se define como el grado en que una comunidad es insensible a la perturbación, y la resiliencia es el fenómeno en el que una comunidad vuelve a su composición original después de ser

perturbada (Allison *et al.*, 2008). Éste fenómeno es conocido comúnmente como recuperación de la comunidad (Griffiths y Philippot, 2013; Shade *et al.*, 2012).

Otro fenómeno que puede ocurrir es que la comunidad muestre redundancia funcional, la cual se refiere a la propiedad de que, incluso cuando la composición de la comunidad es sensible y no es resistente o resiliente, sus funciones siguen siendo similares a las de la comunidad original (Allison *et al.*, 2008); siendo así que, la comunidad microbiana funcionalmente redundante está relacionada con la presencia de especies funcionalmente reemplazables en dicha comunidad (Figura 3). Recientemente, Calderón *et al.* (2017) realizaron un estudio en el que se probó la posibilidad de restaurar suelos degradados mediante el trasplante de comunidades microbianas para así inducir la restauración del ciclo del nitrógeno. Como conclusión, se demostró que el rescate del suelo mediante la adición de complejos microbianos depende de la naturaleza y qué tan fuerte es la interacción entre las especies. También se observó que al introducir nuevas especies de microorganismos en los sistemas que se encuentran en un estado alternativo estable, se observa una disminución en la diversidad filogenética y riqueza de especies.

La restauración del suelo es un gran reto, ya que un ecosistema microbiano es complejo, no lineal y parcialmente impredecible; por otra parte, la aparición de estados alternativos estables durante los procesos de colonización, puede impedir la completa restauración de la estructura de la comunidad y sus funciones, como se puede ver en otros ecosistemas. Sin embargo, se concluye que es posible la restauración del sistema si se implementa una correcta combinación de especies competitivas, permitiendo así la resiliencia dirigida hacia un estado de equilibrio (Calderón *et al.*, 2017). Debido a la complejidad y la no linealidad de las comunidades microbianas ante perturbaciones, se encuentran en la literatura resultados muy variables en cuanto a la estabilidad de la comunidad microbiana frente a perturbaciones secundarias, un ejemplo de esto, se puede comprobar en el resultado obtenido muy recientemente por Calderón *et al.* (2018) donde se demostró que la biodiversidad presente tiene influencia directa en la funcionalidad del suelo.



**Figura 3.** Efectos de perturbaciones sobre la estabilidad de la comunidad microbiana (diversidad, estructura y funcionalidad) del suelo (Información obtenida de Allison *et al.*, 2008; Azarbad *et al.*, 2016; Calderón *et al.*, 2018).

Existe un vínculo entre la resiliencia ecológica y la resiliencia técnica, con base en que la "ralentización crítica" propone que las tasas de recuperación a partir de pequeñas perturbaciones (es decir, resiliencia técnica) se hacen más lentas y más lentas a medida que un sistema se aproxima al punto de equilibrio entre un estado estable a otro (es decir, la resiliencia ecológica) (Van Nes y Scheffer, 2007).

Varios factores pueden conducir a la resiliencia y resistencia de las comunidades microbianas frente a contaminación de metales pesados, incluyendo la sustitución de cepas sensibles por tolerantes; modificaciones genéticas para producir resistencia a los metales pesados; transferencia de genes que codifican resistencia o tolerancia contra estos o disminución de la biodisponibilidad de metales. La transferencia de elementos genéticos móviles mediante



plásmidos entre bacterias taxonómicamente diversas en el suelo está bien descrita (Springael y Top, 2004), lo cual contribuye a la diseminación de genes que proporcionan resistencia al estrés contaminante en toda la comunidad (Sobecky y Coombs, 2009). Como tal, la aparición de resistencia a metales pesados u otros contaminantes en la comunidad microbiana del suelo puede considerarse como un proceso que describe el deterioro de los ecosistemas y es un bioindicador de exposición a contaminantes (Be'rard *et al.*, 2004).

#### **I.4.1 Perturbaciones abióticas provocadas por la contaminación con metales pesados en el suelo**

Los metales pesados se pueden definir como metales o metaloides que tienen densidades mayores a  $\geq 5 \text{ g cm}^{-3}$ , pueden encontrarse naturalmente en el suelo o añadidos de otras fuentes (Oves *et al.*, 2016). La corteza terrestre está compuesta por 95% de roca ígnea (incluyendo metamórficas) y 5% de roca sedimentaria, dentro de esta última, el 80% son lutitas, 15% areniscas y 5% caliza (Parker y Fleischer, 1967). En muchos suelos, los metales pesados constituyen elementos traza que se encuentran en forma de carbonatos, óxidos, sulfuros y/u otros minerales, siendo el mineral dominante de cada metal variable de acuerdo al suelo en cuestión (He *et al.*, 2005).

Se estima que los metales como elementos traza, una vez disueltos, deberían estar presentes en concentraciones bajas ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  o menos) en la mayoría de los suelos, plantas y organismos vivos, entre los cuales se encuentran el cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn), los cuales se requieren para diversos procesos bioquímicos y fisiológicos, encontrándose naturalmente en el ambiente y se concentran como resultado de la actividad humana (He *et al.*, 2005). El suministro inadecuado de éstos micronutrientes da como resultado una variedad de deficiencias, enfermedades o síndromes (Tchounwou *et al.*, 2013) debido a estos metales, ya que, una vez dentro de la célula, pueden unirse a componentes celulares vitales, como proteínas estructurales, enzimas y ácidos nucleicos, e interferir con su funcionamiento. En general, la exposición a largo plazo a metales pesados puede tener efectos cancerígenos, del sistema

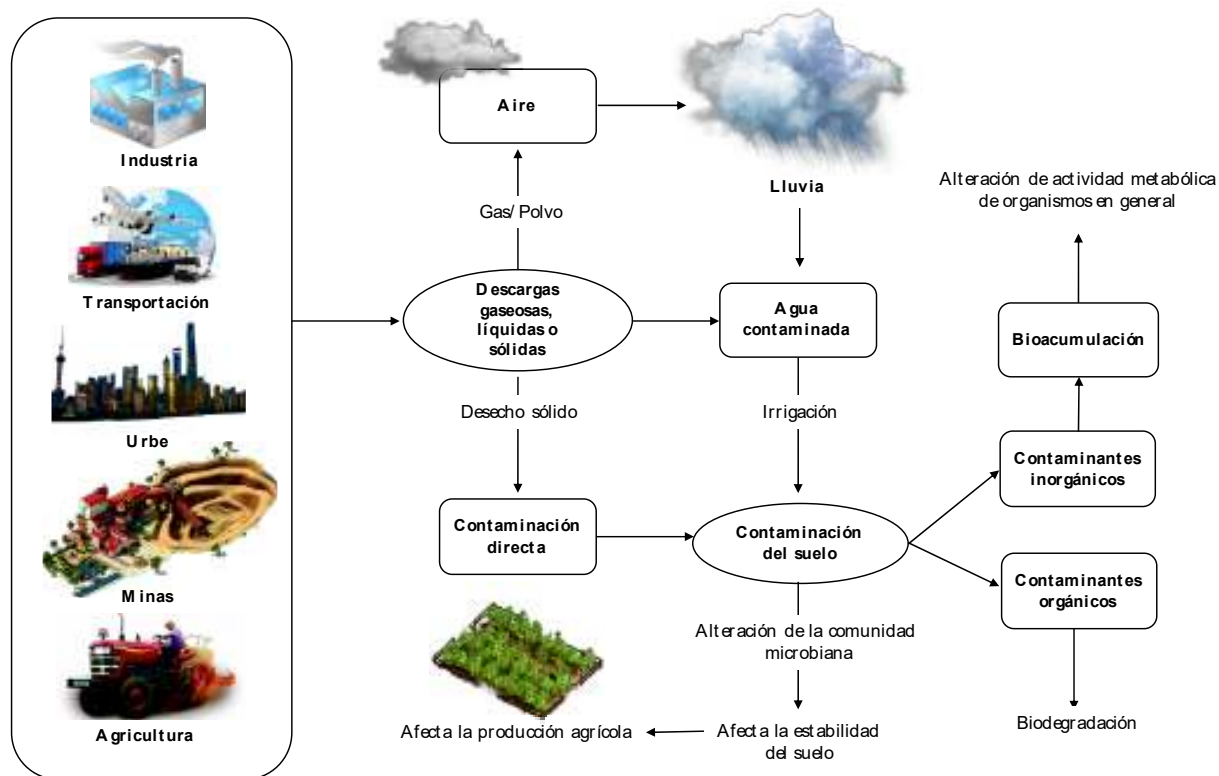
nervioso central y periférico, así como efectos circulatorios en el humano (Raja-Rajeswari y Sailaja, 2014).

Entre los metales que han sido ampliamente estudiados en la última década se incluyen cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), boro (B), cobalto (Co), níquel (Ni), plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr), arsénico (As) y selenio (Se). En éste sentido, Cu, Zn, Fe, Mn, Mo y B son esenciales para el crecimiento normal de las plantas, Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Co y Se son esenciales para el crecimiento y la salud de los animales y los seres humanos y Cu, Zn, Pb y Cd son los elementos más preocupantes desde el punto de vista ambiental, debido a que según se encuentra descrito, causan la contaminación del agua, suelo y las cadenas alimentarias (He *et al.*, 2005). Centrándonos en el Ni y el Zn, hay tres minerales principales que contienen Zn: smithsonita ( $ZnCO_3$ ), esfalerita ( $ZnS$ ) y hemimorfita ( $Zn_4(OH)_2Si_2O_7 \cdot H_2O$ ) y no está claro si alguno de estos minerales determina la disolución de Zn en el suelo. Por otra parte, los minerales que contienen Ni son pentlandita ( $(Fe, Ni)_9S_8$ ), awaruita ( $Ni_3Fe$ ), cohenita ( $(Fe, Ni)_3C$ ) y haxonita ( $(Fe, Ni)_{23}C_6$ ). La formación y disolución de estos minerales contenedores de metales, depende del pH, temperatura, humedad y presencia de carbonatos (He *et al.*, 2005).

Las fuentes naturales de metales pesados, como el transporte de emisiones de los volcanes de polvos continentales y la meteorización de rocas enriquecidas con metales debido a la larga exposición al aire, agregan grandes cantidades de metales a los suelos. También pueden contaminar el suelo a través de las actividades humanas, tales como: 1) la explotación de minas y fundiciones, 2) la aplicación de pesticidas a base de metales y lodos de aguas residuales enriquecidos con metales en la agricultura (Khan *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 1998), 3) la combustión de combustibles fósiles, industrias metalúrgicas y electrónica y 4) el entrenamiento militar, etc.

En éste sentido, las actividades antropogénicas que introducen metales se han clasificado en cinco grupos: 1) la minería y la fundición metalíferas (que contamina con As, Cd, Pb y Hg), 2) la industria (que introduce As, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Ni y Zn), 3) la deposición atmosférica (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg y U), 4) la agricultura (por ejemplo, As, Cd, Cu, Pb, Se, U y Zn) y 5) la eliminación de residuos (por ejemplo, As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg y Zn). Las prácticas agrícolas,

como la aplicación excesiva de fertilizantes fosfáticos para la producción óptima de cultivos (Nicholson *et al.*, 1994), el uso extenso e imprudente de pesticidas tóxicos y el uso de lodos de aguas residuales, pueden provocar la contaminación del suelo (Ahemad y Khan, 2011) (Figura 4).



**Figura 4.** Fuentes de contaminación con metales y sus efectos tóxicos. Modificado de Oves *et al.* (2016).

De esta manera, la concentración de metales en el suelo viene dada por las fuentes litógenicas y antropogénicas que yacen en determinado lugar. Los minerales presentes en la roca

madre sobre la que se desarrolló el suelo, es el principal factor determinante en la concentración de metales pesados; por su parte, la roca madre se compone de material derivado no consolidado que se ve afectado por desgaste y pedogénesis para formar el esqueleto mineral del suelo. El desgaste comprende la descomposición química de minerales; por lo tanto, se liberan sus elementos constituyentes en formas solubles y se pueden formar nuevos minerales (secundarios) mediante reacciones químicas ocasionadas por el mismo desgaste. Los minerales que no se han descompuesto, conforman un residuo insoluble y retienen metaloides que no pueden ser biodisponibles, a su vez, la composición mineral del suelo, derivada de la roca madre que le dio origen, determina su textura y tiene una gran influencia en las propiedades físicas y químicas del suelo (disponibilidad de absorber cationes y aniones, pH, redox, entre otras) (Alloway, 2013).

Respecto a las fuentes antropogénicas, la acumulación de metales y metaloides en el suelo tiene diferentes orígenes, uno de ellos corresponde a la fracción que aportan los desechos de lodos utilizados para el tratamiento de aguas residuales. Los lodos de depuradoras urbanas o biosólidos, son los residuos obtenidos por concentración de la fase sólida que proviene de la depuración de aguas residuales urbanas. Éstas últimas se pueden dividir en dos tipos: 1) aguas negras: procedentes de excretas humanas, orina y heces y 2) aguas grises: provenientes de la limpieza de calles y edificios, así como las aguas domiciliarias que se emplean para higiene personal y doméstica. En éste lodo, por tanto, se puede encontrar un porcentaje elevado de microorganismos próximo al 55 % del peso seco total de la fracción sólida que lo compone y algunos de los cuales son potencialmente patógenos, por lo cual puede suponer un riesgo sanitario (Rocamora *et al.*, 2015).

Los lodos utilizados en suelos agrícolas contienen concentraciones muy altas de elementos traza entre ellos, metales pesados como Cu, Zn, Ni, Pb, Cd y Cr. También se pueden encontrar altas concentraciones en aguas residuales de uso doméstico e industriales, cabe mencionar que el uso frecuente de aguas no tratadas para disminuir las concentraciones de estos metales, contribuye a la acumulación en el suelo (He *et al.*, 2005). Aydin *et al.* (2015) analizaron suelo de Konya, proveniente de 9 sitios irrigados con aguas residuales durante más de 40 años, encontrando la alcalinidad en terreno arcilloso, ocasiona la acumulación de contaminantes en la parte superficial del suelo, siendo por éstas razones, que se ha tratado de implementar técnicas

más amigables con el medio ambiente en la industria agrícola, que no alteren tan drásticamente el medio en el cual yacen las plantas de cultivo.

Con la llegada de la Revolución Verde, la productividad agrícola se ha mejorado con el incremento de fertilizantes y pesticidas, mejoras en los sistemas de irrigación, en los regímenes de manejo de suelo y cosechas, así como cambios de uso de suelo masivos (Tilman *et al.*, 2002). Sin embargo, éstas prácticas han llevado a la creciente degradación de ecosistemas y pérdidas en la productividad a largo plazo, siendo la principal implicación negativa la degradación del suelo por la acumulación de fertilizantes y pesticidas (Hartmann *et al.*, 2015). Los pesticidas que se utilizan para curar o prevenir enfermedades en cítricos, manzana, uva, cereza y pera, también contienen metales pesados, como Cu, Pb, Zn, Pb y As, los cuales se acumulan en el suelo debido a su uso repetido (He *et al.*, 2005). Algunos de estos pesticidas son el arsenato de calcio, acetoarsenato de cobre, sulfato de zinc, Ferbam, entre otros (Freedman y Hutchinson, 1991).

La aplicación de elementos traza en fertilizantes químicos, más comúnmente Cu, Zn, Fe, B y Mn (Fageria *et al.*, 2002), ha sido efectiva para compensar la deficiencia de estos micronutrientes en los cultivos que se desarrollan en suelos arenosos, turbosos y calcáreos. Los fertilizantes de fósforo (P) como los trifosfatos y fosfato de calcio/magnesio contienen concentraciones variables de Cd, dependiendo de la fuente de roca de fosfato. Algunos de estos tipos de fertilizantes contienen más de 5 mg kg<sup>-1</sup> y se encuentra prohibido su uso en varios países (Mortvedt y Beaton, 1995).

La acumulación de metales en el suelo también puede provenir de emisiones de grandes fuentes industriales como la industria minera, industria siderúrgica, de fundidoras y refinerías de metales básicos primarios y secundarios. Se ha reportado que las concentraciones de Pb y As en el suelo, aumentan exponencialmente conforme disminuye la distancia entre la fuente de contaminación y el sitio contaminado (He *et al.*, 2005).

Aunado a todo lo anterior, la contaminación con metales pesados, principalmente por fuentes antropogénicas, se da cuando el suelo no puede sostener una producción normal de plantas o no puede producir comida adecuada para animales o seres humanos, en términos de salud y nutrición, debido a un exceso en el nivel de estos elementos, viéndose así, afectados SE

que nos proporciona el suelo (He *et al.*, 2005). El nivel de impacto de la contaminación medido de acuerdo a su toxicidad para los seres vivos, en especial microorganismos y plantas que yacen en el suelo, se ve influenciado por la movilización y biodisponibilidad de cada uno de los metales introducidos.

### **I.5 Contaminación con metales en suelos de Sonora, México**

Se han encontrado pocos estudios realizados en Sonora que evalúan la contaminación con metales pesados, en ecosistemas terrestres y ríos, aun siendo una de las zonas mayormente activas en la industria minera y agricultura convencional, por lo cual, es necesaria una investigación más a fondo que demuestre los efectos de compuestos metálicos introducidos al suelo.

El estado de Sonora alberga una gran variedad y abundancia de depósitos mineros metálicos y, por mencionar algunos, tiene los principales yacimientos de cobre, molibdeno y oro del país, además de albergar las dos minas más grandes de México: Cananea y La Caridad (Servicio Geológico Minero, 2018). La búsqueda de yacimientos en la región se remonta a las exploraciones de los aventureros que acompañaban a los misioneros jesuitas, durante la colonización del noroeste del país (Bracamonte-Sierra *et al.*, 1997), los primeros registros de explotación datan de 1525 y, por mucho tiempo, la industria minera se desarrolló sin una normativa que regulara la contaminación ambiental que provoca esta actividad, generándose una gran cantidad de desechos tóxicos introducidos al agua, suelo y aire. No fue hasta septiembre de 2004 cuando la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales aprobó, por primera vez en México, una norma para la adecuada disposición de jales mineros, la NOM-141-SEMARNAT-2013 (Dávila-Luna *et al.*, 2018).

Los jales son depósitos de desechos mineros que son transportados como lodos sobresaturados formando terrazas escalonadas en forma piramidal y conforman grandes áreas de exposición de químicos que reaccionan con el oxígeno atmosférico y el agua de la lluvia, por ejemplo, la interacción de los minerales sulfurados del jale, con los factores mencionados, produce la oxidación del sulfuro y la generación del drenaje ácido de mina o lixiviado ácido ( $\text{pH} < 2$ ), lo cual genera iones solubles que, por lo tanto, se encuentran biodisponibles en solución

(Toribio-Jiménez *et al.*, 2017). Cabe mencionar que los desechos mas peligrosos en cuanto a la solubilización de contaminantes, son los que son dispuestos en los arroyos aledaños a las minas, a los cuales se les llama presas de jales (Toribio-Jiménez *et al.*, 2017). Los jales tienen alta incidencia de fallas, por lo tanto, representan un grave problema ambiental, pues en ellos se encuentran metales y metaloides como As, Pb, Cd, Tl, Hg, Cu, Fe, Mn, Co, Ni, Cr, V y el Zn. Una vez, los metales se encuentran en solución, pueden ser transportados por agua y contaminar el suelo, provocando cambios en la textura de éste, desequilibrio en el contenido de nutrientes, baja retención de agua y afectación de ciclos biogeoquímicos (Puga *et al.*, 2006).

El 6 de agosto del 2014, la mina Buena Vista del Cobre derramó 40000 m<sup>3</sup> de lixiviado ácido al arroyo Tinajas, del municipio de Cananea que alimenta el río Bacanuchi, afluente a su vez del Río Sonora (SEMARNAT, 2014). Díaz-Caravantes *et al.* (2016) analizaron la base de datos del monitoreo de la calidad del agua subterránea que aparece en el portal electrónico del Fideicomiso Río Sonora, el cual consta de 19 parámetros estudiados en 34 sitios de muestreo del 18 de agosto del 2014 al 24 de septiembre del 2015. Éste estudio se enfoca en el análisis de los niveles de arsénico, por ser uno de los más peligrosos para la salud, revisando que la NOM 127-SSA1-1994 establece un límite permisible para el arsénico de 0.025 mg L<sup>-1</sup> y la OMS, 0.01 mg L<sup>-1</sup>. Con base en datos obtenidos del fideicomiso del río Sonora, Díaz-Caravantes *et al.* (2016) mencionan que, si se toma en cuenta la primera norma, sólo nueve casos exceden el límite máximo permisible, pero si se toma en cuenta la OMS, 120 casos se encuentran fuera del límite máximo impuesto.

León-García *et al.* (2018) realizaron un estudio en el río Sonora y Bacanuchi, encontrando que los sedimentos mostraron altas concentraciones (mg kg<sup>-1</sup>) de Cu (8-716), Cr (8-90), Fe (7,300-52,400), Mn (80-938), Ni (6-48), Pb (14-210 ) y Zn (41-470), mientras que el orden de movilidad o biodisponibilidad fue Mn > Cu > Ni > Pb > Zn > Fe > Cr, lo cuales se encontraban de manera descendente en óxidos de Fe/Mn > fracción intercambiable del suelo > acoplados a materia orgánica. Cabe destacar que en su estudio demuestran el enriquecimiento antropogénico en ambos ríos para Cu, Cr, Mn, Ni, Pb y Zn, principalmente como derivado de la actividad minera.

Respecto a otras vías de contaminación antropogénica, Villalba-Atondo *et al.* (2013) analizaron la contaminación en el río Agua Prieta, Sonora, México desde un punto previo a su unión con las descargas de las lagunas de oxidación de la ciudad de Agua Prieta, de la empresa textil Alstyle y de la central termoeléctrica de la Comisión Federal de Electricidad, hasta suelos de parcelas de forrajes irrigados con su agua. Las aguas provenientes de la ciudad y la empresa Alstyle, están contaminando el río con sólidos disueltos totales (sales minerales) y con Ni, que supera el valor máximo según la OMS y la EPA, por lo cual se puede convertir en un problema ambiental a corto plazo. Para el caso de las aguas de descarga de la termoeléctrica del lugar, están contaminando el ecosistema moderadamente con sales minerales de As, Cd y Ni, los cuales superan el valor máximo permisible según la NOM 127 y la CE-CCA-001/89. Para el caso de las aguas que son irrigadas a suelo agrícola, se encontró contaminación con Cd, Ni y sales minerales.

Cuando los metales son introducidos al suelo, su movilización y biodisponibilidad comprenden propiedades importantes que afectan a los organismos que yacen en el lugar.

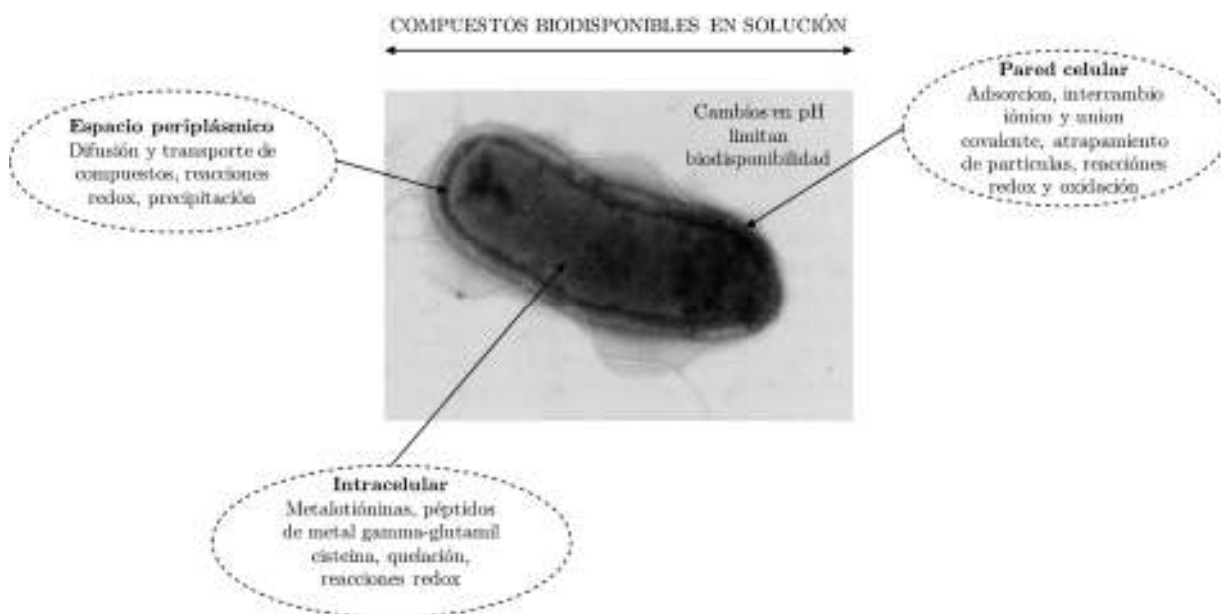
## **I.6 Movilización y biodisponibilidad de metales pesados en el suelo**

Las concentraciones de los metales y metaloides se pueden dividir en totales y biodisponibles para los seres vivos (Alloway, 2013), su concentración puede variar drásticamente en su movilidad, biodisponibilidad e interacciones químicas, probablemente por su capacidad para reaccionar con compuestos, como los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, carbohidratos y enzimas secretadas por microorganismos. Aunado a lo anterior, las bacterias del suelo pueden interactuar con los iones metálicos en solución mediante sus superficies cargadas empleando diferentes mecanismos de captación en sus compartimentos celulares (Figura 5).

Según Oves *et al.* (2016), los metales dentro del suelo se pueden categorizar dentro de 5 formas geoquímicas que contribuyen a su tasa de movilización dentro de la matriz: 1) fracción intercambiable, 2) unidos a carbonatos, 3) unidos a Fe y óxidos de manganeso, 4) unidos a materia orgánica y 5) como metales en disolución. Dicho de otro modo, los metales se encuentran unidos a los diferentes componentes sólidos del suelo, los cuales, de acuerdo a sus características fisicoquímicas, presentan diferente solubilidad y biodisponibilidad, la cual es una



característica determinante para conocer el riesgo potencial en la salud humana y agroecosistemas (González-Flores *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Procesos que contribuyen a la captación microbiana de compuestos metálicos.

La biodisponibilidad de estos metales y metaloides está influenciada por varios factores, tales como: pH, estado de oxidación, niveles de macronutrientes, contenido de agua disponible, temperatura en el medio, así como las características propias del suelo y la naturaleza de la contaminación (Alloway, 2013) (Tabla 3). Sólo una pequeña porción de los metales pesados, se encuentra biodisponible, y su movilidad y biodisponibilidad se encuentran influenciadas, además de los demás factores mencionados, por procesos químicos y bioquímicos como la precipitación-disolución, adsorción-desadsorción, complejación-disociación, y oxidación-

reducción. Cada elemento afecta de diferente manera a cada proceso, pero todos los procesos se ven afectados por el pH y otros procesos biológicos (Olaniran *et al.*, 2013).

**Tabla 3.** Factores que influyen en la movilización de metales en el suelo.

<b>Factor</b>	<b>Descripción</b>
Características del Suelo	pH, potencial redox, composición iónica de la disolución del suelo, presencia de carbonatos, materia orgánica y textura.
Naturaleza de la contaminación	Origen de los metales y formas de deposición
Condiciones ambientales	Acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad

Los mecanismos por los cuales los elementos traza en suelos contaminados pueden ser movilizados son: 1) acidificación: cuyas causas se originan por vertidos de contaminantes ácidos, por una alta tasa de descomposición de materia orgánica en el suelo, lluvia ácida, el proceso de fijación biológica del nitrógeno atmosférico y la oxidación de fertilizantes de amonio, 2) cambios en las condiciones redox, causados por la oxidación y disolución de sulfuros, lo que crea condiciones reductoras que liberan elementos traza adsorbidos a las partículas del suelo, 3) la complejación de especies metálicas con ligandos, 4) cambios en la composición iónica de la disolución del suelo, lo cual desadsorbe nuevamente los elementos de la matriz, formándose así complejos solubles y 4) por metilación de metales, que les confiere la propiedad de poder acumularse en la materia orgánica del suelo o en tejidos ricos en lípidos de raíces de plantas y microorganismos del suelo (Solano-Marín, 2005). La movilización natural de los metales depende de la actividad biológica, interacciones sólido-líquido y la acción del agua en forma soluble y particulada y también por el viento que los transporta en forma de partículas (por lo general compuestos metilados) y los introduce al suelo (Solano-Marín, 2005).

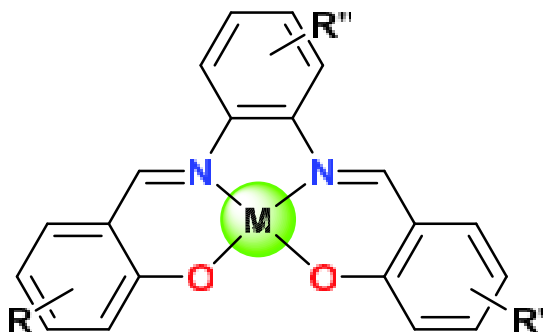
Una vez introducidos al suelo y encontrándose en disolución, lo que los hace altamente biodisponibles, los metales pesados pueden participar en actividades como: 1) conformando la estructura de proteínas y pigmentos, 2) en procesos de oxidación-reducción, 3) regulando la presión osmótica de las células mediante el balance iónico y actuando como componentes enzimáticos (Kosolapov *et al.*, 2004; Zaidi *et al.*, 2011).

Los compuestos metálicos son los contaminantes más comunes y generalizados y, debido a su toxicidad, la contaminación por éstos representa un riesgo potencial para los organismos que viven en el suelo, como las comunidades microbianas (Azarbad *et al.*, 2016) y por ende, tener repercusión en ciclos biogeoquímicos que dirigen.

### **I.7 Compuestos tipo M-salfen y sus usos**

Los compuestos tipo salfen, forman parte de las llamadas bases de Schiff, las cuales han recibido mucha atención por sus propiedades químicas y físicas aplicables ampliamente (Leung y MacLachlan, 2007), y se ha destacado su propiedad catalizadora en reacciones de oxigenación, hidrólisis, electro reducción y descomposición (Kumar *et al.*, 2009), estas bases se forman generalmente como producto de la condensación de salicilaldehídos con *o*-feniléndiamina, y fungen como ligandos de tipo  $N_2O_2$  de una forma relativamente sencilla, que pueden ser coordinados a un metal, formando complejos de tipo M-salfen con muchos metales de transición (Mazlan *et al.*, 2016), entre los que se encuentran el níquel y el zinc (Figura 6), los cuales son objetos de interés en el presente estudio. Éste tipo de complejos M-salfen, presentan una geometría cuadrada en torno al centro metálico, donde los átomos  $N_2O_2$  se posicionan en las esquinas de un cuadro que quela al metal, formando tres metalociclos de 5 miembros, lo cual le brinda estabilidad electrónica y por efecto quelato, en el mismo plano referente a un átomo metálico central (Abd-Karim *et al.*, 2014; Leung y MacLachlan, 2007).

Otros aspectos importantes de la estructura de los compuestos M-salfen, que favorecen diversas interacciones intermoleculares, son la capacidad de crear enlaces oxígeno-metal y el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  (Mazlan *et al.*, 2016; Whiteoak *et al.*, 2012), ésta última propiedad representa una característica muy importante, ya que éste apilamiento es el que ocurre en el ADN (Campbell *et al.*, 2012).

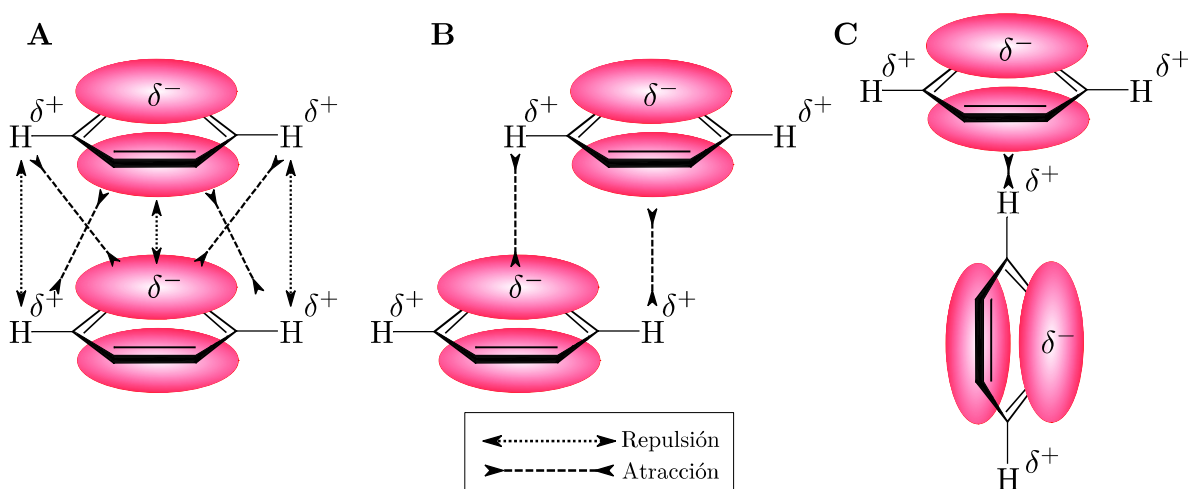


**Figura 6.** Estructura general de un compuesto tipo M-salfen con geometría cuadrada en torno al centro metálico.

El apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , racionalizado por Hunter y Sanders (1990), se clasificó en el conjunto de interacciones no covalentes entre superficies aromáticas. En el modelo desarrollado, se considera el sistema  $\sigma$  y la nube electrónica  $\pi$  del anillo aromático, que queda formado por tres capas: una central constituida por el esqueleto  $\sigma$ , con carga positiva y dos capas con carga negativa para el sistema  $\pi$ . De éste modelo, resultan tres tipos de interacciones: apilamiento de cara a cara (Figura 7A), apilamiento desplazado (Figura 7B) y apilamiento de borde a cara (en forma de T) (Figura 7C) (Butterfield *et al.*, 2002). Dicho lo anterior, los anillos bencénicos de M-salfen con capacidad de apilamiento, pueden intercalar el ácido desoxirribonucleico, insertándose entre bases nitrogenadas que conforman la doble hélice.

Cabe mencionar que, debido a que el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  es débil, es difícil detectar la configuración de apilamiento de interacciones entre compuestos aromáticos; sin embargo, se han utilizado técnicas de espectroscopia, como difracción de rayos X, espectroscopia de fotoelectrones ultravioleta (UV) y espectrofotometría de fluorescencia (Zhuang *et al.*, 2019). Así mismo, se ha observado que distintos factores como el pH, los enlaces de hidrógeno y las

fuerzas de Van der Waals, también contribuyen a la creación de apilamientos  $\pi$ - $\pi$  (Zhuang *et al.*, 2019).



**Figura 7.** Representación esquemática de diferentes configuraciones geométricas de apilamientos  $\pi$ - $\pi$  entre anillos aromáticos. A) apilamiento de cara a cara; B) apilamiento desplazado; C) apilamiento de borde a cara (en forma de T) (Información obtenida de González-García, 2012; Martínez e Iverson, 2012; Zhuang *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que los ligandos que contienen anillos aromáticos, son capaces de realizar apilamientos  $\pi$ - $\pi$  y pueden intercalar el ADN en sitios específicos; las bases nucleotídicas naturales que se encuentran en la molécula: guanina, adenina, timina y citosina, conforman grupos o sistemas conjugados ricos en electrones, que les confieren la capacidad de reaccionar químicamente. Respecto a las proteínas, los aminoácidos aromáticos, como el triptófano, tirosina, fenilalanina e histidina, también permiten reacciones químicas, dadas por la interacción  $\pi$ - $\pi$  con otras moléculas complementarias. Por otra parte, la interacción de ácidos nucleicos o proteínas con anillos aromáticos, en las estructuras de varios sistemas sintéticos de suministro de sustancias, proporciona la base de la aplicación no covalente de fármacos

biológicos en organismos vivos, lo que les confiere diferentes propiedades, como el poder controlar la expresión de genes y tener repercusión en las proteínas que éstos codifican, además de ser moléculas relativamente pequeñas que pueden transportarse fácilmente dentro de la célula (Zhuang *et al.*, 2019),

Una vez dada la intercalación del ADN, por medio de los apilamientos  $\pi$ - $\pi$ , tiene efectos en la estabilización de la estructura de la doble hélice que conforma la molécula (Zhuang *et al.*, 2019), resultando en la alteración de la torsión del ADN, alargando y dilatando el dúplex (Shui *et al.*, 2012). Los cambios estructurales inducidos, son suficientes para interferir con el reconocimiento y la función de las proteínas de unión a dicha molécula (p. Ej., polimerasas y topoisomerasas), que son probablemente los principales determinantes de la selectividad a nivel celular (Terenzi *et al.*, 2013).

Debido a las características estructurales de los compuestos tipo M-salfen se han propuesto recientemente, como biosensores de ADN para su uso en diagnósticos clínicos, monitoreo ambiental, análisis de alimentos, industria farmacéutica y agrícola, identificación forense, así como detección de mutaciones y en estudios patológicos (Mazlan *et al.*, 2016), sustituyendo pruebas tradicionales de hibridación que usan biotina, sustancias radioactivas y marcadores fluorescentes, las cuales comprenden técnicas tardadas, de alto costo y riesgosas. Por otra parte, como biosensores del ácido desoxirribonucleico, ofrecen información confiable de secuencias específicas, de una manera rápida, simple y barata (Li *et al.*, 2005); además, también se ha evaluado su propiedad catalizadora con diferentes substratos (Escárcega-Bobadilla *et al.*, 2013), así como su uso como sensores de moléculas biológicamente relevantes (Escárcega-Bobadilla *et al.*, 2012).

Los compuestos M-salfen son complejos estables con una gran variedad de iones metálicos (Thomas, 2016). Escárcega-Bobadilla *et al.* (2012), prepararon receptores supramoleculares basados en andamios de bis-Zn (salfen) que permitieron la unión química de substratos quirales adecuados, dicha unión produce efectos de quirogénesis que se pueden programar mediante la rigificación del huésped mediante la simple adición de cationes. Dicho fenómeno, es de gran importancia en catálisis supramolecular, con especial atención en la

creación de símiles miméticos enzimáticos cuya composición química sea capaz de acelerar reacciones metabólicas (González-García, 2012).

En otro trabajo de Escárcega-Bobadilla *et al.* (2013) se demostró la propiedad catalizadora de un compuesto Zn-salfen trinuclear, donde se demostró el favorecimiento de la fijación de dióxido de carbono, pudiéndose utilizar hasta 5 ciclos catalíticos sin perder la actividad observada y sin utilizar ni disolvente ni cocatalizador. Es interesante señalar que, en éste último ejemplo, la estructura de M-salfen forma una cavidad central tetraoxigenada, que le confiere quiralidad a la molécula, lo cual es de gran importancia biológica, debido a que facilita la detección específica de moléculas quirales, dado que encajan para llevar a cabo su detección (Escárcega-Bobadilla *et al.*, 2012).

Planteando todo lo anterior, el enfoque de éste estudio se encuentra dirigido en el proceso de oxidación-reducción del ciclo del nitrógeno en relación con la disponibilidad y complejación de los metales pesados en compuestos M-salfen los cuales surgen como acarreadores de una amplia gama de iones metálicos, entre los cuales se encuentran el  $\text{Ni}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$ , con el objetivo de ampliar el conocimiento de éstas estructuras recientemente sintetizadas y elucidar alguna especificidad enzimática dentro del ciclo del nitrógeno, llevado a cabo por la microbiota del suelo.

En el sentido del presente estudio y hasta donde tenemos conocimiento, aun no existen estudios publicados que evalúen el uso de compuestos tipo M-salfen como agentes de perturbación en sistemas terrestres, así como de agua o suelo y, basados en la problemática nacional, sobre todo de zonas áridas como la del estado de Sonora respecto a las actividades antropogénicas como la minería, extracción forestal, urbanización y desarrollos costeros, que han amenazado notablemente la biodiversidad de los ecosistemas terrestres de la región en los últimos años (Martínez-Irizar *et al.*, 2010), consideramos que, evaluar éste tipo de perturbación con compuestos tipo M-salfen de níquel y zinc, basada en la funcionalidad del ciclo del nitrógeno utilizando como aproximación los flujos y balance de los procesos de transformación del nitrógeno en el suelo, lo que resulta novedoso para ser estudiado en sistemas de suelo agrícola, debido a la capacidad acarreadora para el metal que contienen los compuestos tipo salfen y su posible aplicación como controladores de los flujos de la RNI en el suelo

## **II. HIPÓTESIS**

La perturbación de un suelo agrícola con compuestos M-Salfen de níquel y zinc, podría tener efecto en la reserva de nitrógeno inorgánico (amonio, nitrito y nitrato) por afectación principal del metabolismo del nitrógeno llevado a cabo por la microbiota del suelo.



### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. Objetivo general**

Evaluar el ciclo del nitrógeno de un suelo agrícola perturbado con compuestos M-salfen de níquel y zinc.

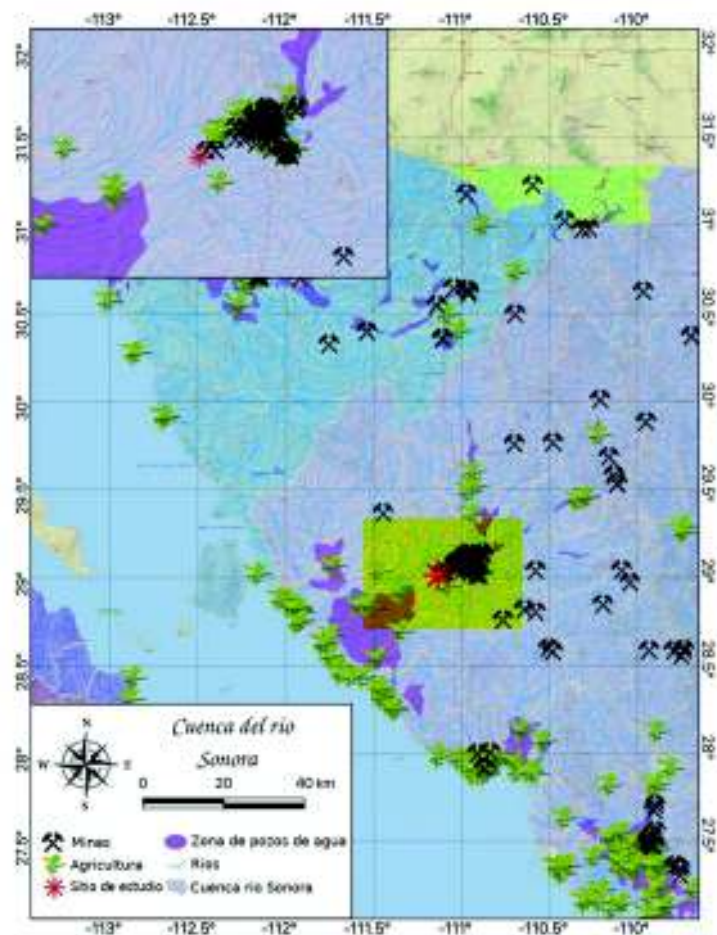
#### **III.2 Objetivos específicos**

1. Definir los cambios en la reserva de nitrógeno inorgánico: amonio, nitrito y nitrato ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) en un suelo agrícola bajo la perturbación abiótica con compuestos M-salfen de níquel y zinc.
2. Explicar la funcionalidad del suelo basado en el ciclo del nitrógeno por efecto de los compuestos M-salfen de níquel y zinc.
3. Construir una librería de amplicones de la región hipervariable V1-V2 del gen ARNr 16S, como paso intermedio de una posterior evaluación de la diversidad bacteriana presente en el suelo, mediante secuenciación másiva de siguiente generación.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1 Muestreo de suelo y diseño experimental

Se utilizó como modelo de estudio un sistema de microcosmos conformado por suelo agrícola proveniente de un campo agrícola sembrado con alfalfa (*Medicago sativa*) en la Costa de Hermosillo, Sonora, México (29°00'37.1"N 111°07'59.3"W); el cual consistió en un cultivo rotatorio (3 meses) de 3 años de antigüedad, donde el uso de pesticidas fue nulo o poco frecuente, del cual se tomaron 30 núcleos de muestras aleatorias separadas entre sí por un mínimo de 10 metros de distancia, con un nucleador de 30 cm de profundidad (Figura 8).



**Figura 8.** Sitio de muestreo de suelo. Campo agrícola de Alfalfa (*Medicago sativa*) en el Departamento de Agronomía y Ganadería de la Universidad de Sonora, ubicado en la Costa de Hermosillo, Sonora, México (Información obtenida de INEGI, 2019).

El suelo colectado se tamizó en malla de 4 mm y se mezcló para crear una sola muestra compuesta, la cual fue distribuída en 164 microcosmos con 55 g de suelo cada uno. Después de 8 días de aclimatación, se perturbó el suelo con 2 formas diferenciadas por un grupo OH (A) o dos grupos OH (B) de dos compuestos sulfen distintos; níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) y zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), respectivamente (Figura 9); los cuales fueron aplicados cada forma a 2 diferentes concentraciones, establecidas con base a los límites máximos permitidos por la EPA (McLean y Bledsoe, 1992) para cada metal. La forma A y B de Ni-Salfen se aplicó a 15 y 30 mg  $\text{kg}^{-1}$  de suelo, cada una (NiSA15, NiSA30, NiSB15 y NiSB30, respectivamente); mientras que la forma A y B de Zn-Salfen se aplicó a 30 y 50 mg  $\text{kg}^{-1}$  de suelo, cada una (ZnSA30, ZnSA50, ZnSB30 y ZnSB50, respectivamente) (Tabla 4). Cada perturbación se aplicó en lotes de 18 microcosmos, conservando un lote de otros 18 sin perturbar, como grupo control.

El lote completo de microcosmos con todos los tratamientos fue incubado a 25°C en condiciones de esterilidad, tapados con un tapón de gasa, para permitir el intercambio de gases atmosféricos, en un intervalo entre 60-80% de capacidad de retención de agua (WHC) por un periodo total de 240 días, tomándose 3 microcosmos de cada tratamiento a los 8, 15, 30, 60, 120 y 240 días. En cada punto de muestreo fue determinado el porcentaje de humedad, pH, RNI y se extrajo el ADN del suelo para la generación de librerías para análisis posteriores de diversidad microbiana.



**Figura 9.** Compuestos M-salfen de níquel y zinc. A) Forma A de Ni-salfen (NiA) con 4 anillos bencénicos y 1 grupo hidroxilo; B) forma B de Ni-Salfen (NiB) con 3 anillos bencénicos y 2 grupos hidroxilo; C) forma A de Zn-salfen (ZnA) con 4 anillos bencénicos y 1 grupo hidroxilo y D) forma B de Zn-salfen (ZnB) con 3 anillos bencénicos y 2 grupos hidroxilo.

**Tabla 4.** Descripción química de compuestos M-salfen utilizados.

	<b>M-salfen</b>			
	<b>NiA</b>	<b>NiB</b>	<b>ZnA</b>	<b>ZnB</b>
Fórmula	C <sub>26</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> NiO <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> NiO <sub>4</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Zn	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Zn
Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	466.1411	407.0508	472.8277	413.7374
Donantes de enlaces de hidrógeno	1	2	1	2
Aceptores de enlaces de hidrógeno	3	4	3	4
<b>Composición (%)</b>				
C	66.993	59.014	66.046	58.060
H	4.1084	3.9620	4.0503	3.8979
N	6.0097	6.8821	5.9247	6.7709
O	12.592	14.419	10.151	15.468
Metal	10.297	15.722	13.828	15.802

#### IV.2 Determinación del tamaño y textura de las partículas del suelo

El suelo no perturbado se analizó en el laboratorio de ingeniería Benesto (Hermosillo, Sonora, México), mediante el método granulométrico mecánico por tamizado (Narsilio y Santamarina, 2016), vertiendo el suelo a través de los tamizes para granulometría gruesa y fina, dispuestos sucesivamente de mayor a menor abertura. Posteriormente, se pesó el suelo acumulado en cada tamiz ( $P_a$ ) y el peso total ( $P_t$ ), siendo la suma de todos los pesos retenidos en cada nivel, para obtener el porcentaje de gravas, arenas y finos que pasan los tamizes ( $R_a$ ), mediante la siguiente fórmula:

$$\% R_a = \frac{P_a}{P_t} - 100$$

Posteriormente, se realizó la clasificación del suelo mediante el Sistema Unificado de Clasificación de Suelos (SUCS).

### **IV.3 Determinación de la reserva de nitrógeno inorgánico y metales**

Para éste análisis se utilizaron 15 g de suelo de cada microcosmo sacrificado en cada punto de muestreo, los cuales se mezclaron con 60 ml de KCl 1M. Se agitó vigorosamente a 250 rpm por 1 h y se dejó reposar hasta que el material sólido se asentó para después extraer el sobrenadante y filtrarlo en papel filtro tipo Whatman No. 2. El líquido filtrado se colocó en tubos graduados estériles y se almacenaron a -20°C hasta su análisis, siguiendo el protocolo propuesto por Keeney y Nelson (1982).

El extracto fue analizado en el laboratorio de ecología microbiana de la FES-Iztacala (UNAM), para conocer la concentración de nitrógeno inorgánico total: amonio, nitrito y nitrato ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) mediante espectrofotometría por el método de Forster (1899).

Para conocer la concentración de níquel y zinc al inicio (8 días) y final del estudio (240 días), se analizaron 10 gr de suelo de cada microcosmos en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, empleando un equipo de espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado generado por microondas (MP-AES) marca Agilent MPES 4200. La muestra fue digerida en horno de microondas marca Anton Paar, modelo Multi WavePRO, empleando ácido  $\text{HNO}_3$  y para la calibración se empleó un estándar certificado marca High-Purity Standards Cat QCS-27, Lote 1826134.

### **IV.4 Determinación del pH**

Se analizaron 5 gr de suelo provenientes de cada microcosmo, de acuerdo a la ISO-10390:2005 (ISO, 2005), se determinó el pH utilizando un electrodo de vidrio en una suspensión de suelo (Hanna Instruments HI 2210-01) en 1:5 en agua (pH en  $\text{H}_2\text{O}$ ). El agua utilizada tuvo una conductividad específica no superior a  $0.2 \text{ mS m}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y un pH superior a 5.6 (Grado 2 de agua según ISO 3696: 1987), por lo cual se utilizó agua destilada. Luego, se tomó una porción representativa de la muestra de al menos 5 ml y efectuó la lectura con ayuda del potenciómetro. La muestra fue sometida a agitación continua durante  $60 \text{ min} \pm 10 \text{ min}$  y  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para posteriormente dejarse reposar entre 1 y 3 h. Durante el procedimiento, se cuidó mantener la muestra bien cerrada para evitar contacto con el aire y se calibró el potenciómetro como lo indica

el manual del fabricante, usando las soluciones buffer de pH 4, 7 y 9 a 20 °C ± 2 °C. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT, 2002), que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo, estudios, muestreo y análisis, se especifican los criterios de evaluación del suelo respecto a su pH (Tabla 5) las lecturas de las muestras fueron evaluadas.

**Tabla 5.** Criterios de evaluación de un suelo de acuerdo a su pH. Información obtenida de SEMARNAT (2006).

<b>Categoría</b>	<b>pH</b>
Fuertemente ácido	< 5.0
Modernamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	8.5

#### **IV.5 Determinación de humedad del suelo**

Se analizaron 5 gr de suelo provenientes de cada microcosmo mediante el método gravimétrico, el cual consiste en pesar en la balanza analítica, después secar en horno a 140°C durante 24 h para después dejar enfriar y nuevamente obtener el peso de cada muestra. Por convención, se asume que el peso que se pierde es debido al agua presente en el suelo de acuerdo a SEMARNAT (2006) para así obtener el porcentaje de humedad, utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{tara + pes humed (g)} - \text{tara + peso seco a } 140^{\circ}\text{C (g)}}{\text{tara + peso seco} - \text{tara (g)}} * 100$$

## **IV.6 Generación de la librería de productos de PCR para su posterior análisis de la diversidad bacteriana presente.**

Se generó la librería referente a productos de PCR iniciando con la extracción del material genético (ADN).

### **IV.6.1 Extracción de ADN de suelo**

La extracción de ADN del suelo se realizó con el kit comercial FastDNA<sup>®</sup> SPIN para suelos (MP Biomedicals, LLC, Sólón, OH, EE. UU.) en el laboratorio de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Para ello, se realizó la lisis mecánica utilizando perlas y una matriz de sílice. Se agregaron hasta 500 mg de muestra a 978 µl de tampón de fosfato de sodio y 122 µl de tampón MT en tubos de matriz E de lisis. La mezcla se homogeneizó en el robot FastPrep<sup>®</sup> durante 40 s a una velocidad de 6.0 por dos ciclos, después de lo cual se centrifugó a 14,000xg durante 15 min para sedimentar los residuos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de microcentrífuga de 2.0 ml. Después de esto, se agregaron 250 µl de PPS (Disolución de Precipitación de Proteínas) y la disolución se mezcló manualmente agitando 10 veces los tubos y dejando reposar en baño de hielo por 5 min. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 14,000 xg durante 5 min para recuperar el sobrenadante el cual fue transferido a un tubo limpio de 15 ml. La matriz de unión se resuspendió y se agregó 1 ml al sobrenadante anterior en el tubo de 15 ml. Posteriormente, los tubos fueron invertidos manualmente durante 2 min para permitir la unión del ADN y se mantuvieron inmóviles durante 3 min para permitir la sedimentación de la matriz de sílice.

Los primeros 500 µL del sobrenadante se retiraron y desecharon teniendo cuidado de evitar desechar la matriz de unión sedimentada que contenía el ADN. La matriz fue resuspendida luego en el sobrenadante restante. Aproximadamente 600 µL de la mezcla fue transferida a un filtro SPIN filter y se centrifugó a 14,000 xg durante 1 min. Los tubos de captura se vaciaron y la mezcla restante se añadió al mismo filtro de la etapa anterior con el fin de formar un gránulo sobre el filtro SPIN filter y se agregan 500 µL de solución de lavado SEWS-M preparada para resuspenderlo suavemente usando la fuerza del líquido de la punta de la pipeta.

Los tubos de captura se centrifugaron a 14.000 x g durante 1 minuto, después de lo cual se vaciaron y se reemplazaron. Sin ninguna adición de líquido, el sistema se centrifugó por segunda vez a 14,000 xg durante 2 min para "secar" la matriz de la disolución de lavado residual, la cual contenía etanol. Los tubos de captura fueron desechados y reemplazados por otros limpios. Los Spin Filters fueron secados al aire durante 5 min a temperatura ambiente y la matriz de unión se resuspendió suavemente (sobre el filtro SPIN) en 60 µL de DES (agua sin ADN / pirógeno). Estos tubos fueron incubados a 55 °C por 5 min y posteriormente se llevó a cabo una última centrifugación a 14,000 x g durante 1 minuto para llevar el ADN eluido a los tubos de captura limpios y así obtener el material genético, el cual fue almacenado a -20°C para su posterior utilización.

Finalmente, la calidad del ADN genómico extraído se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó su concentración mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), cuidando obtener una pureza óptima de entre 1.8 y 2, como resultado del cociente de absorbancia A260/A280 (Lee *et al.*, 2012) y que la concentración no fuera menor a 1 ng/µl.

#### **IV.6.2 Construcción de la librería de genes**

Se utilizaron primers o cebadores específicos para amplificar la región hipervariable V1-V2 del gen ARNr 16S (Figura 16) como los describe Camarinha-Silva *et al.* (2014), usando los primers:

27F (5'-ACGACGCTCTTCCGATCTAGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y 338R (5'-GACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (Etchebere y Tiedje, 2005).

El primer forward contiene un código de barras de 6 nt (Meyer y Kircher, 2010) y un enlazador de CA de 2 nt (Hamady *et al.*, 2008); ambos primers comprenden secuencias complementarias a los adaptadores específicos de la plataforma Illumina MiSeq® (Illumina, Hayward, California, USA) en los extremos 5'. La primera amplificación se llevó a cabo en el laboratorio de epifluorescencia del DICTUS en un volumen total de 25 µl con 2.5 µl de Buffer 10x, con MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, desoxinucleótidos trifosfato a una concentración de 10 mM, 2 µl de



ADN molde y 0.15  $\mu$ l de Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), realizando un primer paso de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos que consistían en: desnaturalización a 94°C por 20 s, alineamiento a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 1 min; por último, la extensión final fue a 72°C por 5 min, para después mantener la reacción a 4°C. Al término del proceso en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA), los fragmentos amplificados se verificaron en gel de agarosa al 2% mediante electroforesis, adicionando 1  $\mu$ l de GelRed (Figura 16).

Los primeros productos de PCR fueron precipitados en 3 volúmenes de etanol y 1:10 de acetato de sodio 3M y pH 5.2, los cuales se conservaron a -20°C ON (toda la noche). Posteriormente fueron centrifugados a máxima velocidad y el sobrenadante fue desechado para conservar el pellet que contenía el producto de PCR concentrado y ser enviado a su posterior proceso, que fue desarrollado en el Hospital Universitario de Magdeburg, Alemania. 1  $\mu$ l del pellet anterior se tomó como molde en una segunda reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un volumen de 50  $\mu$ l con buffer 5X, conteniendo cada desoxinucleótido trifosfato a una concentración de 2.5 mM, cada primer a una concentración de 0.2 mM y 0.2 mM de TaKara Taq, realizándola bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero durante 10 ciclos, usando primers de PCR diseñados para integrar la secuencia de los primers específicos multiplexados para secuenciación en Illumina MiSeq® (Illumina, Hayward, California), con los primers índice. Cabe mencionar que se incluyeron controles sin ADN (utilizando agua como molde) y permanecieron negativos después de las dos rondas de PCR. Los amplicones se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa, para posteriormente purificarse utilizando los kits de placas de 96 pocillos Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificaron con el reactivo y el kit de ADN PicoGreen de Quant-iT (Invitrogen, Darmstadt, Alemania). Las bibliotecas se prepararon mediante la agrupación de proporciones equimolares de amplicones (200 ng de cada muestra) obtenidas de 96 muestras, todas etiquetadas con un código de barras único.

#### **IV.7 Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R (versión 3.6.1) con un  $\alpha=0.05$ . Para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados y su efecto en el tiempo; se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para la separación de medias, con el paquete agricolae (Mendiburu y Simon, 2007). Dentro de los análisis multivariados, se realizó un análisis de coeficientes canónicos para determinar la recuperación en el tiempo de los tratamientos con el paquete vegan (Oksanen *et al.*, 2013) y un análisis de componentes principales (PCA) para comparar los diferentes perfiles de diferenciación entre tratamientos en el tiempo, con el paquete ggfortify (Horikoshi y Tang, 2015). Con el fin de comprobar estadísticamente las diferencias encontradas en el análisis multivariado, se realizó un PERMANOVA con la función adonis del paquete vegan. Por último, se realizó un análisis de regresión local ponderada para describir la nitrificación en relación a los cambios de pH. Todas las gráficas se estilizaron utilizando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016).

## V. RESULTADOS

### V.1 Textura del suelo

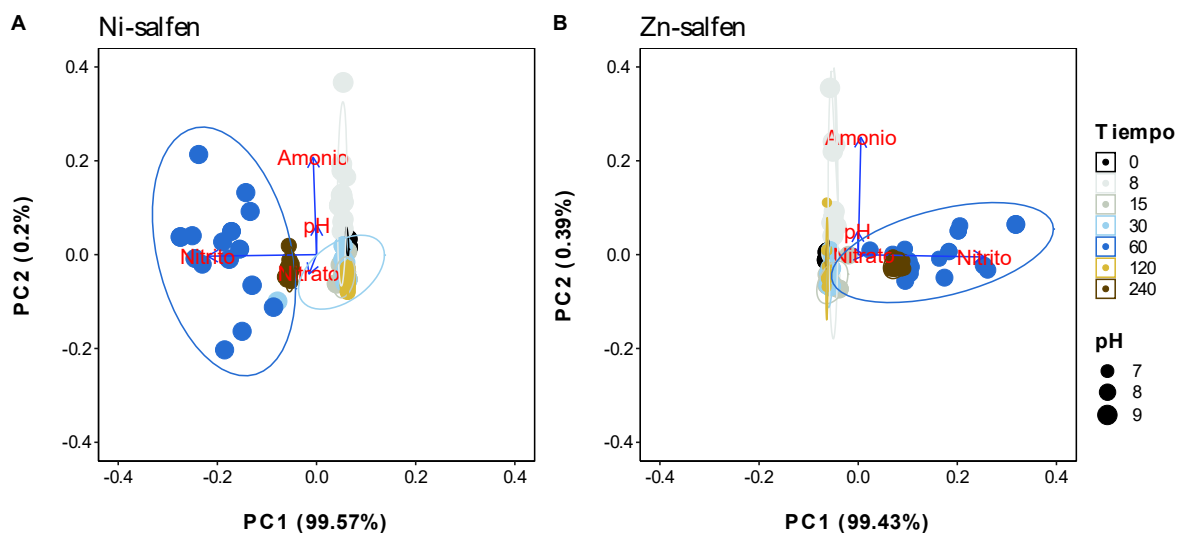
Los resultados obtenidos del análisis granulométrico (Tabla 6), mostraron que el suelo estaba compuesto de 0% gravas, 29.1% de arenas y 70.9% de finos, con un porcentaje de límite líquido de 33.5, lo cual permitió clasificar el suelo como limo arcilloso.

**Tabla 6.** Análisis granulométrico de suelo.

<b>Num. malla (abertura en mm)</b>	<b>Cantidad que pasa la malla (%)</b>
Malla 3" (76,2 mm)	100.0
Malla 2" (50,8 mm)	100.0
Malla 1 1/2" (38,1 mm)	100.0
Malla 1" (25,4 mm)	100.0
Malla 3/4" (19,1 mm)	100.0
Malla 1/2" (12,7 mm)	100.0
Malla 3/8" (9,5 mm)	100.0
Malla No. 4 (4,75 mm)	100.0
Malla No. 10 (2 mm)	99.8
Malla No. 20 (0,85 mm)	98.2
Malla No. 40 (0,42 mm)	93.8
Malla No. 60 (0,25 mm)	90.4
Malla No.100(0,15 mm)	82.9
Malla No.200(0,07 mm)	70.9

## V.2 Funcionalidad del ciclo del nitrógeno y movilización de níquel y zinc

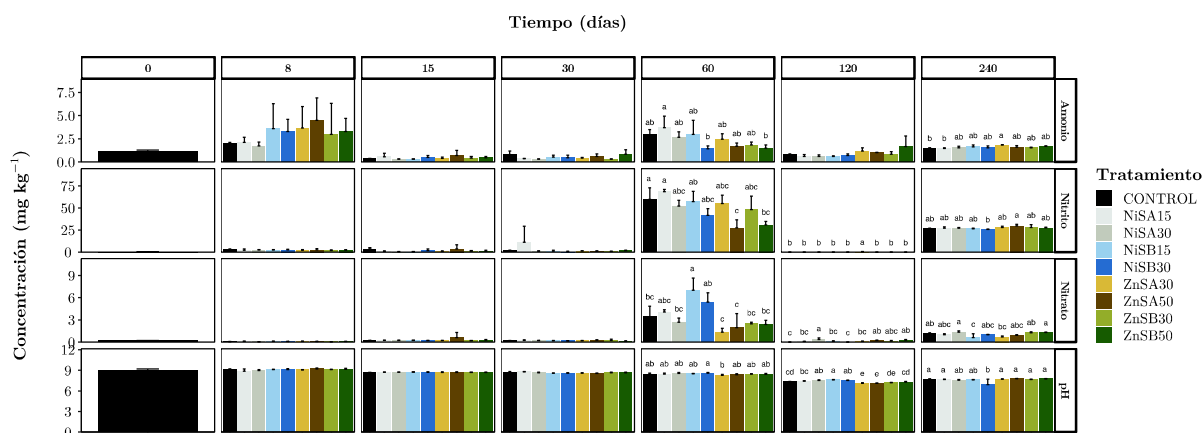
Ante las diferentes perturbaciones aplicadas con los compuestos M-salfen de níquel y zinc, se vio un efecto estadísticamente significativo en la RNI y pH entre cada tratamiento ( $p < 0.05$ ) y tiempo muestreado ( $p < 0.05$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Análisis de componentes principales de tratamientos con M-salfen de níquel y zinc incluyendo control, durante el tiempo. A) Tratamientos perturbados con Ni-salfen y control; B) Tratamientos perturbados con Zn-salfen y control.

A los 8 días después de la perturbación, se observó una respuesta en el aumento de la concentración únicamente de amonio, como indicador de la RNI; sin embargo, entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.56$ ), así mismo no se observaron diferencias significativas en los indicadores de nitrito y nitrato ( $p=0.63$ ,  $p=0.053$ ; respectivamente) (Figura 11). A los 15 y 30 días posteriores a las perturbaciones la reserva de amonio disminuyó en todos los tratamientos y no se observaron diferencias de pH entre

tratamientos, viéndose en promedio un pH de 9 los primeros 30 días (Figura 11). La humedad se mantuvo estable en un 20% durante todo el estudio.



**Figura 11.** Respuesta de la reserva de nitrógeno inorgánico y pH en los tratamientos con M-salfen de níquel y zinc, incluyendo control. Los tratamientos que comparten una letra, no son estadísticamente diferentes respecto a sus medias ( $\alpha$  de Tukey = 0.05).

Llegados los 60 días posteriores a las perturbaciones se encontraron las mayores concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en todo el estudio. Así, la respuesta del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) ante la perturbación con M-salfen, se diferencia entre tratamientos a los 60 días ( $p < 0.05$ ), en donde el compuesto NiSA15 mostró la mayor concentración ( $3.7 \text{ mg kg}^{-1}$  suelo) pero sin diferencias significativas comparando con la media de los demás tratamientos incluyendo el control, a excepción de ZnSB50 y NiSB30, que conforman otro grupo con las menores concentraciones ( $1.5$  y  $1.4 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente). Respecto al proxy nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), se observó una respuesta estadísticamente diferente entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), en donde NiSA15 mostró la mayor concentración ( $68.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), pero no difiere de los demás tratamientos a excepción de ZnSB50 y ZnSA50 ( $30.7$  y  $27.5$ , respectivamente), que si son diferentes respecto a NiSA15 y el control. Referente a la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), también se encontraron

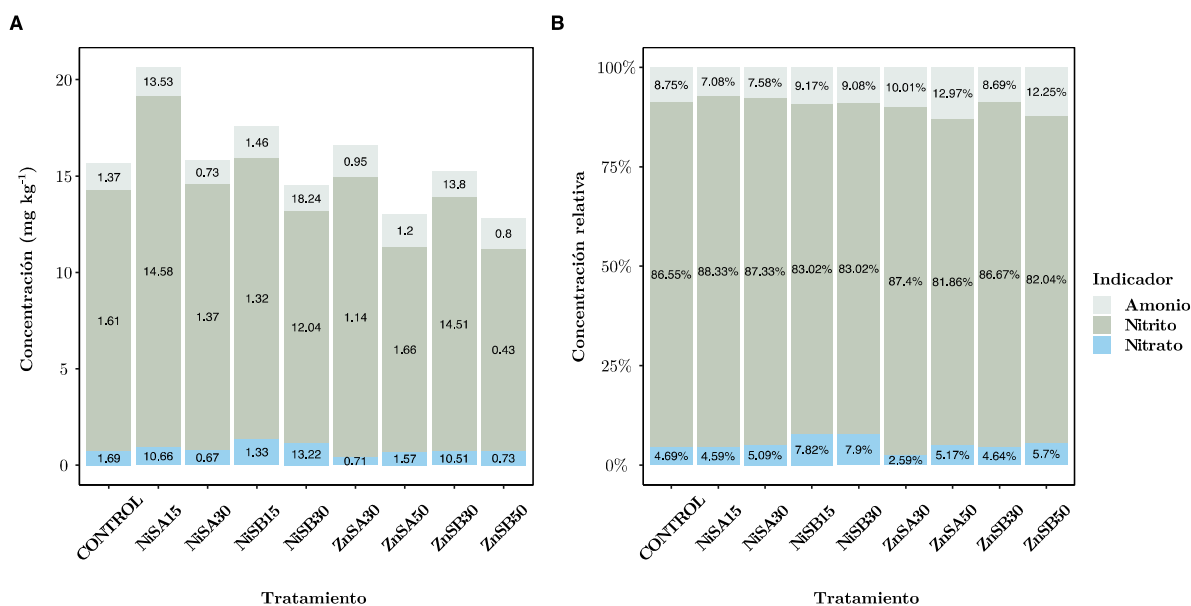
diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), en donde NiSB15 se mantuvo con la mayor concentración ( $6.9 \text{ mg kg}^{-1}$  suelo), pero no difiere respecto a NiSB30 y NiSA15 ( $5.4$  y  $4.0 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente); sin embargo, NiSB15 si es diferente respecto al control ( $3.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y a todos los tratamientos con M-salfen de zinc, que mostraron menor concentración, pero no son diferentes al control. En cuanto al pH, el tratamiento que mostró mayor potencial fue NiSB30 con  $8.6$  y fue diferente a ZnSA30 con  $8.2$ ; sin embargo, ninguno de estos es estadísticamente diferente respecto al control.

A los 120 días posteriores a las perturbaciones iniciales se observó un panorama similar al ya observado a los 15 y 30 días en los tres indicadores de las especies nitrogenadas cuantificadas, resultando en una disminución significativa respecto a los 60 días del tratamiento. En éste tiempo, no se observaron diferencias entre tratamientos en el amonio ( $p = 0.0546$ ), pero si en el nitrito ( $p < 0.05$ ) y en el nitrato ( $p < 0.05$ ). Se observó un efecto interesante en todos los tratamientos comparado con el muestreo anterior (60 días), ya que en éste tiempo (120 días), el nitrito se redujo en un 100% en todos los tratamientos, a excepción de ZnSA30 ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ); sin embargo, si se encontró nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en los microcosmos, en donde NiSA30 mostró la mayor concentración ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y fue diferente y mayor respecto al control ( $0.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), NiSB15 ( $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), ZnSA30 ( $0.09 \text{ mg kg}^{-1}$ ), NiSA15 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y NiSB30 ( $0.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), pero no diferente a ZnSB50, ZnSA50 y ZnSB30. ( $0.2, 0.2, 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente). Respecto al pH, en éste tiempo si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) en donde NiSB15 mostró el mayor pH ( $7.6$ ), siendo diferente a NiSA15, control, y todos los demás tratamientos con M-salfen de zinc. Por otra parte, ZnSA30 y ZnSA50, mostraron el menor potencial ( $7.1$  y  $7.0$ , respectivamente) siendo diferentes respecto al control y NiSB15.

Al final del experimento, es decir, alcanzados los 240 días posteriores a las perturbaciones iniciales, el  $\text{NH}_4^+$  se diferenció entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) y todos aumentaron su concentración respecto al muestreo anterior (120 días) y el tratamiento con la mayor concentración fue ZnSA30 ( $1.8 \text{ mg kg}^{-1}$ ), siendo estadísticamente igual a todos los demás tratamientos incluyendo M-salfen de níquel, a excepción del control y NiSA15 ( $1.5, 1.4 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente), con los cuales difirió. La especie nitrogenada  $\text{NO}_2^-$  presentó diferencias entre tratamientos ( $p = 0.0725$ ) y aumentó su concentración en todos estos respecto al muestreo

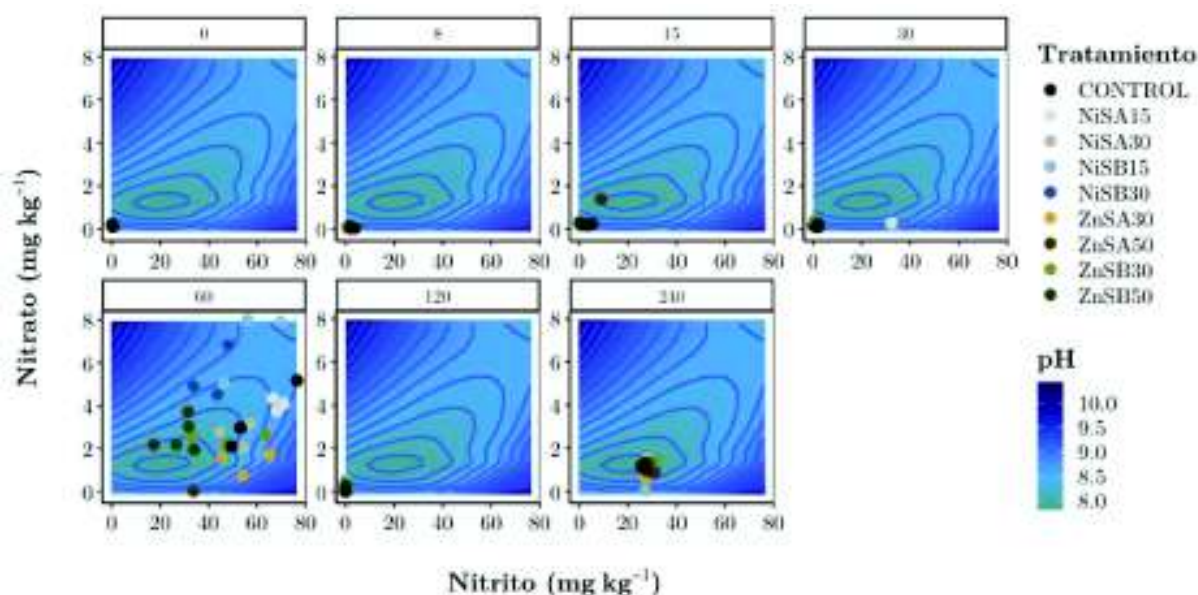
de 120 días y en éste tiempo (240 días) ZnSA50 tuvo la mayor concentración ( $29.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), pero no difirió respecto al control y los demás tratamientos, pero si de NiSB30 ( $25.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ). La cuantificación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) fue mayor para todos los tratamientos respecto a los tiempos anteriores muestreados excepto 60 días, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), en donde NiSA30 y ZnSB50, mostraron las mayores concentraciones ( $1.3$  y  $1.2 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente), pero no fueron diferentes a los demás tratamientos, a excepción de ZnSA30 y NiSB15 ( $0.6$  y  $0.6 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente). El pH se diferenció nuevamente entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), viéndose que NiSB30 mostro el menor pH ( $6.9$ ) respecto al control y todos los demás tratamientos.

En todos los tratamientos se vio que aproximadamente el 85% de toda la RNI, consistió en nitrito (independientemente del tiempo muestreado) y el amonio se mantuvo en mayor proporción que el nitrato (Figura 12B).



**Figura 12.** Reserva de nitrógeno inorgánico. A) Concentración de amonio, nitrito y nitrato en cada tratamiento; B) Concentración relativa (%) de amonio, nitrito y nitrato en cada tratamiento.

Al inicio del estudio en todos los tratamientos, incluyendo el control, se observó un intervalo de pH entre 9.2 y 8.9; mientras que a los 120 días el pH disminuyó dentro de un intervalo de 7.6-7.1 y a los 240 días aumentó ligeramente en un intervalo de 7.7-6.9, por lo que se observó un efecto en éste parámetro del suelo, pasando de pH básico a neutro en todos los tratamientos (Figura 13). El análisis de regresión local ponderada nos indicó que la diferenciación entre tratamientos se dio con la disminución de pH a los 60 días, en donde vimos que los M-salfen de níquel mostraron mayor concentración de nitrito y nitrato, conforme disminuyó el pH; en el caso de M-salfen de zinc no hubo tanto aumento de nitrito y nitrato, pero si presentaron los menores valores de pH.



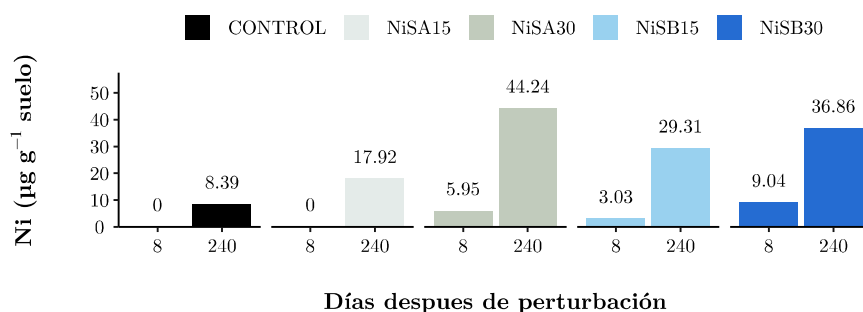
**Figura 13.** Nitrificación en tratamientos con relación a cambios de pH, durante el tiempo.

Los resultados de la cuantificación de los metales al inicio y final de los tratamientos mediante absorción atómica, mostraron que entre los tratamientos con Ni-salfen y el control, se

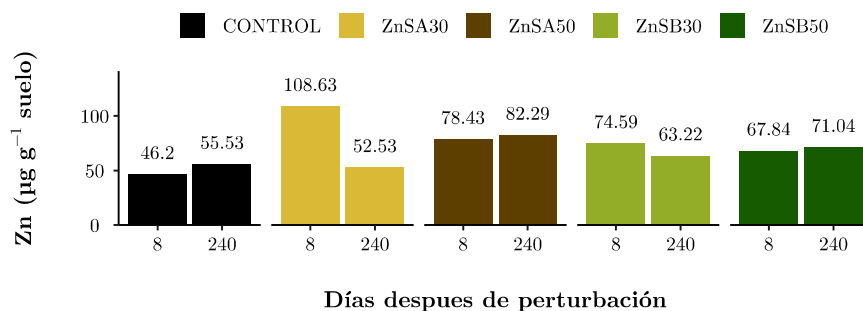


observó un aumento en la concentración del metal entre los 8 y 240 días para todos los compuestos empleados, con mayor contraste en NiSA30 a los 240 días (Figura 14A) sugiriendo una acumulación del níquel en el suelo. Así mismo en los tratamientos con Zn-salfen, se observó que el tratamiento ZnSA30 y ZnSB30 redujeron la concentración del metal al final del experimento al mismo nivel que el control respecto al inicio de las perturbaciones. Los resultados referentes a las perturbaciones causadas con ZnSA50 y ZnSB50 mostraron un ligero aumento de Zn; sin embargo, la reducción del metal no se alcanzó como en el control (Figura 14B).

**A**



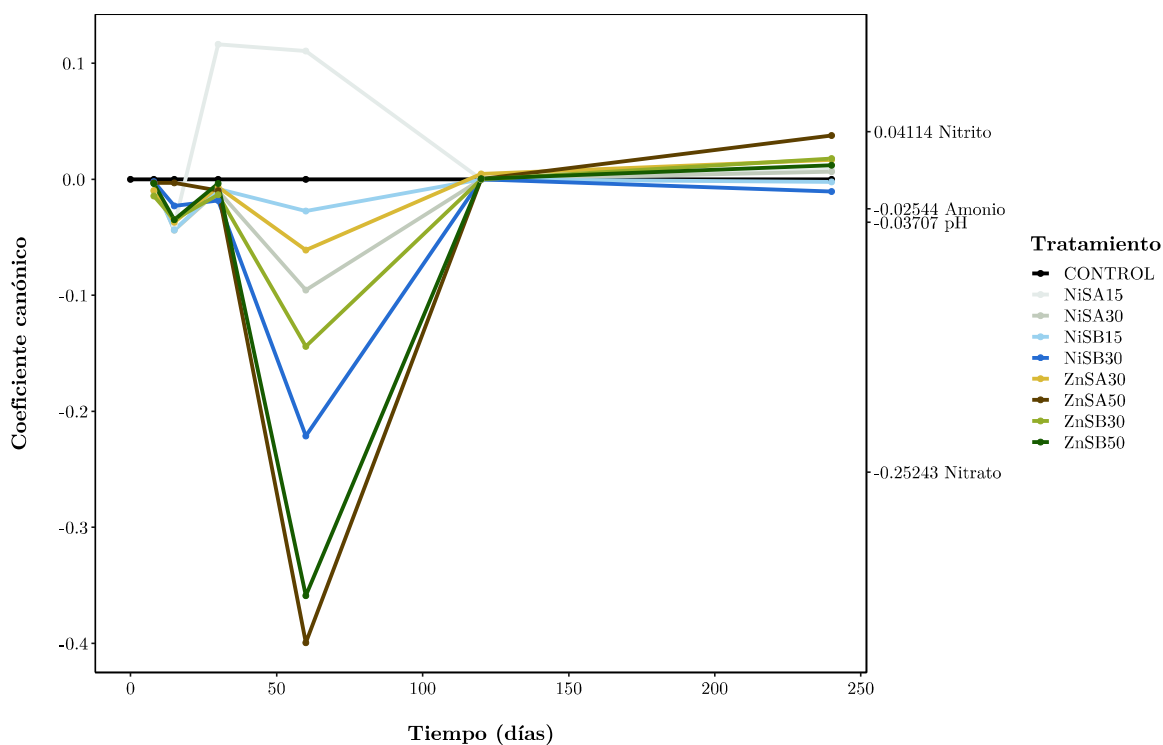
**B**



**Figura 14.** Movilización de níquel y zinc bajo la perturbación con M-salfen.

### V.3 Recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno

La recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno a lo largo del estudio no fue lineal, viéndose que se obtienen perfiles similares en los 8, 30 y 120 días después de las perturbaciones con M-salfen, sólo diferencias puntuales se observaron entre algunos tratamientos a los 15 días. Alcanzados los 60 días, los tratamientos se diferenciaron entre si (Figura 15). Se observó de igual manera, que el amonio fue la especie que menos difirió entre el control y tratamientos independientemente del tiempo muestreado, lo que indicó mayor estabilidad durante el tiempo en éste indicador del ciclo del nitrógeno.



**Figura 15.** Efectos de M-salfen sobre la recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno. Se representa una curva de respuesta principal de las concentraciones de la RNI y pH a lo largo del tiempo. Los coeficientes canónicos indican la distancia entre la concentración de la RNI en las muestras de todos los tratamientos en relación con el control no perturbado.

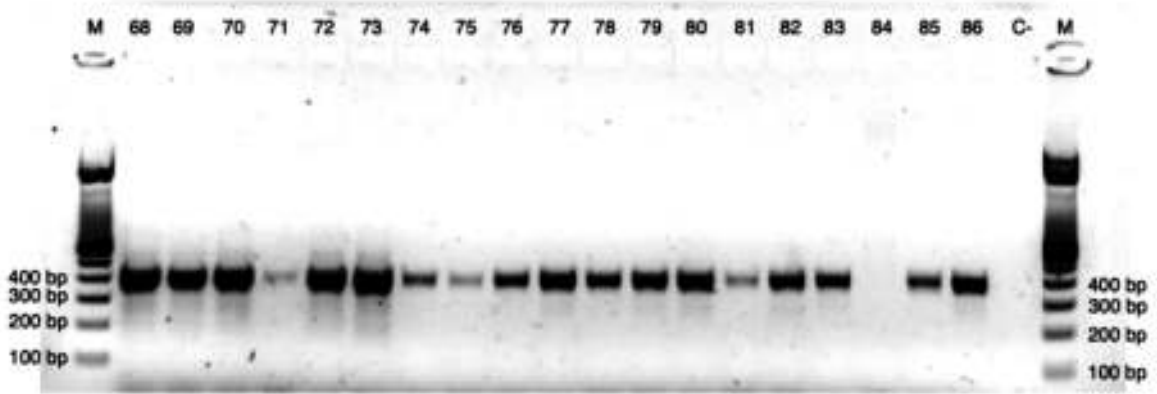
Por otro lado, el nitrito y nitrato fueron las especies nitrogenadas que indujeron mayormente la diferenciación entre tratamientos, sobre todo a los 60 días, en donde se pudo observar, basándonos en su distancia respecto al control, que NiSA15 muestra mayor concentración de nitrito mientras que ZnSA50 y ZnSB30 con menor concentración. Respecto al nitrato, el tratamiento que mostró mayor concentración fue NiSB15 y los que menos ZnSA50 y ZnSB30.

El análisis de componentes principales en los tratamientos con Ni-salfen y Zn-salfen, durante el tiempo, demostraron la correlación de las diferentes variables fisicoquímicas evaluadas respecto a la RNI como proxy de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno en el suelo, demostrando que los cambios ocurridos en el sistema se correlacionaron con el efecto del tiempo y la perturbación aplicada con los compuestos tipo M-salfen de níquel y zinc, entre cada tiempo muestreado (basándonos en los análisis de varianza en cada tiempo) (Figura 11 y Figura 15).

#### **V.4 Construcción de la librería de genes**

Se amplificó la región V1-V2 del gen ARNr 16S (Figura 16). Se realizó una serie de amplificaciones con el fin de obtener la misma concentración de ADN en cada muestra, basándonos en la intensidad de las bandas visualizadas en gel de agarosa al 2%, utilizando un fotodocumentador Gel DocTM XR+ de BioRad, esperando obtener un fragmento de aproximadamente 400 bp, que incluye la región V1-V2 con los primers específicos para la posterior secuenciación en Illumina.

Durante varias amplificaciones, el control negativo resultaba positivo, mientras que las muestras no se amplificaban, por lo cual se aumentaron las medidas asépticas y se modificó el programa original (ILLU8) aumentando el tiempo de alineación, pasando de 30 segundos a 35 segundos, de éste modo, el control negativo resultó consistente.



**Figura 16.** Construcción de la librería de genes. Verificación en gel de agarosa al 2% de amplicones correspondientes a la región hipervariable V1-V2 del gen ARNr 16S

## VI. DISCUSIÓN

### VI.1 Funcionalidad del ciclo del nitrógeno y movilización del níquel y zinc

En los resultados obtenidos se observó que la RNI no responde antes de los 60 días, frente a la perturbación con M-salfen. Éste periodo de aparente estabilidad en los indicadores del ciclo del nitrógeno, puede deberse a que los microorganismos que dirigen el ciclo, se mantuvieron en un periodo de adquisición de genes de resistencia ante los metales acoplados a M-salfen (Azarbad *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2016; Spain y Alm, 2003), primeramente transportandolos dentro de la célula, mediante el sistema de captura de magnesio CorA, el cual es rápido e inespecífico ante  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  y es dependiente del gradiente quimiosmótico existente a través de la membrana citoplásmica; también puede suceder mediante ATPasas tipo P o mediante proteínas de la familia HoxN. Una vez los compuestos metálicos se encuentran dentro del citoplasma de la célula bacteriana y se acumulan, los genes que codifican dichos sistemas transportadores, mutan obteniéndose genes tolerantes a metales, sin causar daño a la célula bacteriana (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Los microorganismos resistentes poseen mecanismos de captura y destoxificación de metales, que son llevados a cabo por transformaciones enzimáticas de oxidación y reducción, por lo cual dentro del citoplasma celular pueden formar enlaces coordinados con aniones que bloquean grupos funcionales de enzimas, inhibir sistemas de transporte, desplazar metales esenciales desde los sitios nativos de enlace en proteínas (Marrero-Coto *et al.*, 2010) y de esta manera modificar reacciones metabólicas microbianas tales como el ciclo del nitrógeno. Estudios previos como los reportados por Das *et al.* (2016) sugieren que es importante conocer qué especies han desarrollado resistencia a metales, para ser utilizados en técnicas de biorremediación (Das *et al.*, 2016).

La razón por la cual el amonio aumentó a los 8 días en todos los tratamientos, podría deberse a que las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  como *Azotobacter* y *Bradyrhizobium* (Isobe *et al.*, 2014; Stein *et al.*, 2016); así como las reductoras de nitrito con la enzima reductasa de asimilación de nitrito (sirohaem-Nir) (Cabello *et al.*, 2004), se aclimataron en todos los microcosmos, ocasionando la acumulación del amonio. La posterior disminución de  $\text{NH}_4^+$  a los

15 y 30 días, se podría deber a que éste se oxidó a  $\text{NH}_2\text{OH}$  por bacterias que presentan la enzima amoniaco monoxigenasa (Cabello *et al.*, 2004), y es por esto que no detectamos su reciclaje a  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ .

El perfil obtenido a los 60 días, mostró un aumento drástico en las concentraciones de las tres especies nitrogenadas medidas en la RNI (Figura 5), lo cual puede ser atribuido a que pasados 60 días a partir de la perturbación inicial se favorecieron los nichos de bacterias fijadoras de nitrógeno, nitrificantes y desnitrificantes (Cabello *et al.*, 2004), tanto en tratamientos como en control. Otro aspecto por el cual, se pudo deber éste aumento general de la RNI, es la disminución de pH en todos los tratamientos (llegando a un pH alcalino de 8). Norton y Stark (2010) mencionaron que con la disminución de pH, aumenta la oxidación de amonio debido a la disminución exponencial de  $\text{NH}_3$  disponible, lo cual podría explicar el aumento de nitrito y nitrato. Por otro lado, plantean que la presencia persistente de amonio a pesar de la disminución de pH, se puede deber a la existencia de micrositios en la matriz del suelo con pH mas alcalino, en donde se puede llevar a cabo la fijación de  $\text{N}_2$  o amonificación.

El aumento de  $\text{NH}_4^+$  se puede deber al favorecimiento de bacterias y arqueas fijadoras de  $\text{N}_2$ , previamente descritas por Isobe y Ohte (2014) y Stein y Klotz (2016), y reductoras de  $\text{NO}_2^-$ , así como al desfavorecimiento de las bacterias aerobias oxidadoras de amonio (Cabello *et al.*, 2004), en todos los tratamientos incluyendo el control. En el caso de ZnSB50 y NiSB30, los cuales mostraron menor concentración de  $\text{NH}_4^+$ , estos microorganismos pudieron resultar desfavorecidos. La disminución de amonio nos indica que la forma B de M-salfen (independientemente del metal ligado y la concentración aplicada), pudo ocasionar que se afectaran éstas tres vías, de tal manera que disminuyera el  $\text{NH}_4^+$ , presente en el suelo, apoyando y complementando lo obtenido por Epelde *et al.* (2010), quienes reportaron afectación de la oxidación de amonio bajo la perturbación con Zinc a 250 y 1,000  $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo en forma de  $\text{ZnCl}_2$ . En el caso de NiSB30, diferimos con Wurr Rodak *et al.* (2018), quien reporta el aumento de la fijación de nitrógeno; sin embargo, cabe mencionar que ellos perturbaron el suelo con 0.5  $\text{mg kg}^{-1}$  de níquel en suelo, cuya concentración difiere respecto a la aplicada con NiSB30 (30  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Esto último sustenta el hecho de que el níquel es necesario en concentraciones traza por los microorganismos ( $10^{-1} \text{ mmol L}^{-1}$ ), como lo reporta Marrero-Coto *et al.* (2010) y es por lo cual que Wurr Rodak *et al.* (2018), reportaron dicho resultado en su estudio. Por otra parte,

Desde el punto de vista de la agronomía, el amonio resulta la principal fuente inorgánica de nitrógeno para las plantas y es comúnmente utilizado como fertilizante, además, su propiedad insoluble le confiere la capacidad de no filtrarse hacia aguas subterráneas en el suelo, aumentándose así la probabilidad de su asimilación por parte de otros organismos, a diferencia del nitrato que es más fácilmente movilizado y puede ocasionar la eutrofización del medio (Hirsch *et al.*, 2015), es por esto que los fertilizantes amoniacaes son muy comunes en prácticas de agricultura convencional; sin embargo, varios estudios como el de Miller *et al.* (2007) demuestran la toxicidad de saturación de amonio en el suelo, que puede provocar la inhibición del crecimiento de raíces y brotes que se asocian con la clorosis de las hojas y desequilibrios iónicos en las plantas, alteración de los gradientes de pH (causando acidificación, y en el presente estudio pasamos de pH básico a neutro) a través de las membranas o causando estrés oxidativo (Liu y Von Wirén, 2017).

Miller *et al.* (2007) han reportado que la concentración de amonio debe ser mínimo tres órdenes de magnitud menor que la concentración de nitrato con el fin de no ocasionar toxicidad, además, su alta concentración en el medio, puede aumentar la capacidad de cambio catiónico y saturar la reserva soluble de toda la reserva de nitrógeno, ocasionando acumulación de nitrito y nitrato (Liu y Von Wirén, 2017). En el presente estudio, independientemente del tiempo muestreado, en todos los tratamientos el amonio se mantuvo en mayor concentración que el nitrato (Figura 12). Planteado lo anterior y conforme a los resultados obtenidos, M-salfen en su forma B, independientemente del metal y la concentración, podría utilizarse como depresor de la concentración de amonio en suelos, cuando éste alcance niveles tóxicos.

Respecto al nitrito a los 60 días, todos los tratamientos incluyendo el control y en mayor medida NiSA15, se mantuvieron con concentraciones altas comparando con ZnSB50 y ZnSA50 quienes disminuyen el indicador. Se ha descrito que la acumulación de éste intermediario de la nitrificación entre amonio y nitrato, no es asimilable por las raíces de las plantas (no tiene importancia agronómica) y se puede lixiviar a aguas subterráneas causando eutrofización, así como el nitrato (Martínez-Espinosa *et al.*, 2011), y en concentraciones  $<5$  mM, es tóxico para las bacterias que lo oxidan a nitrato (Martínez-Espinosa *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011). En éste sentido, Su *et al.* (2011) reportaron que el nitrito encontrado en el suelo proveniente de suelo franco agrícola, puede reaccionar con iones  $H^+$  y formar ácido nitroso ( $HNO_2$ ) el cual es

inestable y se descompone formando  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y, a su vez, el  $\text{NO}_2$  que es un gas de efecto invernadero, es liberado a la atmósfera, desproporcionándose en presencia de agua, formando en ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y  $\text{HNO}_2$ , éste último reoxidándose en presencia de oxígeno diatómico ( $\text{O}_2$ ) a  $\text{HNO}_3$ , el cual ocasiona la presencia de éste compuesto en la atmósfera, conllevando a la lluvia ácida (Kameoka, *et al.*, 1977); es por lo cual que M-salfen de zinc a la mayor concentración, independientemente de la forma aplicada, podría utilizarse como supresor de nitrito en el suelo y así, obtener beneficios ecológicos de respectivos compuestos.

Cabe mencionar que se ha recomendado mantener la concentración de nitrito debajo del nivel tóxico para bacterias, ya que son los principales agentes conversores de nitrito a nitrato, siendo éste último, la fuente más importante de nitrógeno para las raíces de las plantas, reduciéndolo y asimilándolo en aminoácidos que conforman proteínas estructurales que fomentan su crecimiento (Dechorgnat *et al.*, 2011). Nelson *et al.* (2016) han demostrado que, en la mayoría de los casos, independientemente del tipo de suelo y perturbación (cambio de pH, temperatura, humedad, etc.), cuando existe una acumulación de nitrito, se debe a que se ha estimulado el primer paso de la desnitrificación (reducción de nitrato a nitrógeno molecular), por lo tanto, la acumulación de nitrito observada en todos los tratamientos, incluyendo el control y en mayor medida en NiSA15, pudo suceder.

Para poder ver diferenciación de NiSA15 respecto al control y los demás tratamientos, posiblemente fue necesario aumentar el número de réplicas en el estudio, debido a que hemos utilizado un análisis de varianza, que es un modelo de regresión lineal múltiple, en el que la variable respuesta depende directamente de la variable independiente, basándonos en el hecho de que con el aumento de observaciones, se disminuye la desviación estándar de la variable estudiada, acercando así la media muestral  $\hat{\mu}$  a la media poblacional  $\mu$ , y a su vez disminuye también la probabilidad de cometer error tipo 1, al momento de realizar las comparaciones múltiples entre medias mediante la prueba *post-hoc* de elección (Hastie *et al.*, 2017; James *et al.*, 2017). Éste enfoque se basa en el fenómeno que se conoce comúnmente como la maldición de la dimensionalidad o efecto Hughes (Bellman, 1961) en la cual se plantea que, si se aumenta el número de variables respuesta, el volumen del espacio estudiado aumenta exponencialmente, haciendo que los datos disponibles se vuelvan dispersos, lo cual confiere un problema para cualquier método que requiera significancia estadística.



Por otra parte, el hecho de que NiSB15 haya aumentado la concentración de  $\text{NO}_3^-$  a los 60 días en el suelo, comparado con el control, nos indica la estimulación de la nitrificación en el medio, llevada específicamente por bacterias con la enzima nitrato reductasa asimilatoria (Cabello *et al.*, 2004). Los estudios que han evaluado el efecto de la perturbación con níquel en el ciclo del nitrógeno del suelo, se han enfocado en el proceso de fijación de  $\text{N}_2$ , encontrando que, con la aplicación de solución nutritiva de cloruro de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) 1 mM, aumenta la actividad hidrogenasa (implicada en la fijación de nitrógeno) de los nódulos de *Rhizobium japonicum*; a los 52 días después de la perturbación, se excedió el tratamiento control en aproximadamente un 45%, aunque el efecto promotor desapareció en el día 100, aparentemente como resultado del aumento de la toxicidad del Ni (Weisany *et al.*, 2013). En nuestro caso, pudo ocurrir que al tener amonio disponible en los microcosmos, se haya provisto el  $\text{NH}_4^+$  necesario para estimular la nitrificación en NiSB15.

El hecho de que ZnSB50 y NiSB30 disminuyeran la fijación de  $\text{N}_2$  en el suelo a los 60 días (por las bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  que mostraron, acoplado a la disminución de pH), así como NiSB15 que estimuló la presencia de  $\text{NO}_3^-$ , puede deberse a que la estructura de M-salfen en su forma B (independientemente del metal coordinado y la concentración), al tener 2 grupos hidroxilo, se propone que sean más solubles en agua y que puedan ser transportados pasivamente dentro de la célula bacteriana, ocasionando la alteración de la actividad enzimática implicada en el ciclo del nitrógeno.

Los resultados observados a los 120 días resultan interesantes ya que la presencia de nitrato fue nula a excepción de ZnSA30, por otra parte, si se encontró nitrato y en mayor medida en NiSA30, ZnSB50, ZnSA50 y ZnSB30, lo que elucida que Zn-salfen, independientemente de la forma y concentración aplicada, induce a la nitrificación completa en el suelo, por la presencia de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , sin presentar  $\text{NO}_2^-$ . En estudios previos, se ha reportado que *Nitrospirae* Linaje II, perteneciente a las bacterias tipo comammox, puede realizar el proceso de nitrificación completo, sin expeler nitrato al medio (Daims *et al.*, 2015; Hu y He, 2017; Van Kessel *et al.*, 2015); por lo tanto, la presencia de nitrato pero no nitrato, podría deberse a la presencia y desarrollo de éste tipo de bacterias, agregando que se ha reportado que la nitrificación aumenta con la disminución de pH (Aislabie y Deslippe, 2013) y en el presente estudio pasamos de pH básico a neutro.

Conforme la evolución del tiempo a partir de las perturbaciones con los diferentes compuestos M-salfen, el pH del suelo fue cambiando de 9.19 (8 días) a 7.71 (120 días) y 7.77 (240 días). En éste sentido, se ha demostrado que el pH es un factor muy importante que afecta la movilidad de los metales en la matriz del suelo (Galán-Huertos y Romero-Baena, 2008; Giller *et al.*, 1998) y la mayoría de éstos, tienden a estar más biodisponibles a pH ácido porque son menos fuertemente adsorbidos por las partículas del suelo (excepto el As, Mo, Se y Cr, que son más móviles a pH alcalino) (Galán-Huertos *et al.*, 2008). Basándonos en el hecho de que el pH disminuyó pasando de básico a neutro, se ve una tendencia a la acidificación, por lo cual se elucidó que, entre los 8 y 60 días, inició la asimilación bacteriana de M-salfen, confiriéndole resistencia a la comunidad frente a dichos compuestos, en un periodo de latencia de 60 días, sin mostrar cambios en la funcionalidad del ciclo del nitrógeno.

Los resultados encontrados respecto a la movilización de los metales acoplados en los compuestos M-salfen y, comparando con los obtenidos en el análisis de coeficientes canónicos, el incremento en la concentración tanto de Ni como de Zn en los respectivos tratamientos al final del experimento, se puede deber a la disminución del pH, favoreciéndose la asimilación de compuestos metálicos en el suelo, incluyéndose los aplicados y los que se encontraban naturalmente asociados a las partículas del suelo, primeramente por biosorción, que implica la retención de metales catiónicos en la membrana bacteriana con carga negativa (Ramasamy *et al.*, 2007), para después assimilarlos en su organismo y de este manera, inducir la resistencia en la microbiota presente, por medio de la aparición de genes de resistencia (Galán-Huertos *et al.*, 2008; Ojuederie y Babalola, 2017). También pudo darse la precipitación de los metales, como lo describió Ramasamy *et al.* (2007), mediante los exudados bacterianos que conforman complejos con la biomasa bacteriana viva o muerta (Toribio-Jiménez *et al.*, 2017), debido a la disminución del pH, contribuyendo a descomplejación de los iones metálicos de las partículas del suelo y a la oxidación de los minerales que los contienen (Morawska-Płoskonka y Niklińska, 2013). También pudo ocurrir que se indujo una bioestimulación, la cual consiste en aumentar la cantidad de nutrientes y enzimas en el suelo, con la finalidad de promover las bacterias indígenas y sus mecanismos de estabilización intrínsecos para los metales (Toribio-Jimenez *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que según la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, al inicio y al final del estudio, las concentraciones de Ni se encuentran debajo de la media requerida en suelos

agrícolas ( $1,600 \text{ mg kg}^{-1}$  suelo) y se denota que el Zn no se incluye dentro ésta norma. Si tomamos en cuenta los parámetros que establece la EPA (McLean y Bledsoe, 1992) para el Ni ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$  suelo) y Zn ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ), todas las concentraciones al inicio y final del estudio, en todos los tratamientos, quedan por debajo de la media que se estipula en suelos.

La actividad de bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  y nitrificantes a los 60 días, pudo contribuir a la acumulación final de metales encontrados por absorción atómica, ya que las bacterias resistentes a metales desarrollan mecanismos de rápida asimilación y destoxificación de sustancias, tomando en cuenta que el sistema de captación de níquel y zinc (CorA) conforma una “puerta abierta” y siempre está activa al ser constitutivo (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Así pues, los resultados obtenidos en el presente trabajo, podrían sugerir su posible utilización como una alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con níquel y zinc; sin embargo, es necesario seguir investigando sobre la citotoxicidad de dichos compuestos sobre la microbiota y plantas que yacen en el suelo. En las últimas décadas, diferentes esfuerzos han sido realizados con el objetivo de implementar técnicas de biorremediación que utilicen microorganismos en conjunto con plantas (fitoextracción), que movilicen los metales de la matriz del suelo por biosorción (Gadd, 2004; Ojuederie *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha demostrado que la biorremediación *in situ* con bacterias, se puede llevar a cabo con microorganismos disimilatorios reductores usando compuestos orgánicos como donadores de electrones, de tal manera que los metales pesados puedan ser complejados y precipitados (Gadd, 2004; Lovley *et al.*, 2004). Para el presente estudio, los resultados sugieren que pudieron estimularse los nichos de bacterias nitrificantes, lo cual provocó disminución en el pH y causó la liberación de níquel y zinc de las partículas del suelo, simulando una especie de “cosecha” de ambos metales, mediante su adsorción a la superficie celular bacteriana (biosorción), como lo reportan Daverey *et al.* (2014) ocurrido con anammox adsorbiendo zinc dentro de un reactor; debido a éste fenómeno, pudo ocurrir que mediante el análisis de absorción atómica, se detectó incremento de níquel y zinc a los 240 días en todo los tratamientos, a excepción del caso de ZnSA30 y ZnSB30, lo cual puede atribuirse a que la concentración aplicada no fue suficiente para inducir cambio en el pH del suelo, de tal manera

que indujeran la disociación de iones de Zn externos, tomando en cuenta que el Ni y Zn son menos solubles, conforme aumenta el pH (Galán-Huertos *et al.*, 2008).

## **VI.2 Recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno**

El análisis de coeficientes canónicos mostrados en la Figura 6; muestran una posible resistencia de la comunidad microbiana hasta los 60 días, ante la perturbación con M-salfen. Varios autores han estudiado la respuesta en la comunidad microbiana y su funcionalidad en respuesta a contaminación con metales pesados, conllevando a resultados diferentes entre ellos, pero la mayoría confluye en el hecho de que después de un tiempo relativo de exposición a metales, aumenta la aparición de genes resistentes. Azarbad *et al.* (2016) plantearon que la dificultad entre comparar estudios entre sí, yace en que cada situación tiene una historia diferente, no sólo en términos de tipo de suelo y metales contaminantes, si no también en términos del tiempo de exposición al metal y la tasa de adaptación de las comunidades microbianas ante la perturbación.

El amonio y el nitrato fueron los principales inductores de diferenciación entre tratamientos a los 60 días posteriores a las perturbaciones y los resultados obtenidos sustentan los encontrados en el análisis de varianza para cada tiempo y tipo de perturbación. En éste momento pudo ocurrir el pico máximo de adaptación de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y nitrificantes, explotando la resistencia adquirida ante los metales, mediado por el sistema de captación CorA (Marrero-Coto *et al.*, 2010), también por la transferencia horizontal de genes funcionales entre bacterias, que confieren adaptabilidad ante perturbaciones (Husnik y McCutcheon, 2018), disminuyendo así, toda la RNI a los 120 días y posiblemente induciendo a la proliferación de organismos especialistas (como *Nitrospira* Linaje II), el cual es un fenómeno que se reporta en comunidades de organismos ante cambios ambientales (Fuchsman *et al.*, 2017; Wright *et al.*, 2019).

El perfil obtenido a los 240 días, nos mostró el aparente incremento y recuperación de la RNI en todos los tratamientos, pudiéndonos indicar que, la comunidad microbiana que dirige el ciclo del nitrógeno, termina al final del estudio en un estado alternativo estable, como lo plantea Shade *et al.* (2012) que puede suceder ante perturbaciones ambientales y lo describe mediante un análisis multivariado, así como en el presente estudio. Éste estado alternativo estable implica

el establecimiento de una nueva estructura espacial de los componentes analizados mediante análisis multivariados (como PCA, NMDS, CCA), pero sin comprometerse la funcionalidad del sistema.

Desde el punto de vista económico y agronómico, y basándonos en el análisis de coeficientes canónicos y de componentes principales, el mejor momento para obtener beneficios respecto a la aceleración de la nitrificación, sería a los 60 días después de la aplicación de M-salfen, en específico NiSB15. De manera general, los resultados obtenidos apuntan a que los compuestos M-salfen de níquel aplicados podrían tener una propiedad catalizadora de la amonificación y nitrificación. Escárcega-Bobadilla *et al.* (2013) demostraron la propiedad catalizadora de un compuesto Zn-salfen trinuclear, favoreciendo la fijación de dióxido de carbono, pudiéndose utilizar por más de cinco ciclos catalíticos sin perder la actividad observada y sin utilizar ni disolvente ni cocatalizador. En el presente trabajo, los compuestos M-salfen de Zinc, resultaron depresores de la amonificación y nitrificación en el suelo.

### **VI. 3 Librería de genes**

Los primers utilizados fueron 27F y 338R (Camarinha-Silva *et al.*, 2014), para amplificar dos regiones del gen ARNr 16S, específicamente la V1-V2 en conjunto, debido a la consistencia que proporcionan al momento de llevar a cabo la anotación taxonómica de bacterias, pudiendo detectar una amplia gama de microorganismos hasta nivel de género en aguas residuales (Guo *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se construyó la librería con variaciones que difieren del protocolo original (Illumina, 2013a). De manera general, para la realización de secuenciación por Illumina, es necesario realizar una primera PCR punto final para amplificar las secuencias de interés utilizando primers específicos, posteriormente se realiza una segunda PCR punto final para incorporar una secuencia adaptadora que permita realizar el PCR puente que se lleva a cabo durante la secuenciación en la plataforma de Illumina y en la que se incorporan secuencias indicadoras para cada amplicón, de tal manera que, al obtener los resultados posteriores a la secuenciación, sea posible identificar cada uno de los amplicones secuenciados (Meyer y Kircher, 2010). En nuestro caso, se obtuvieron amplicones con la longitud reportada para las

regiones V1-V2 del gen ARNr 16S (Gürsoy *et al.*, 2019), con la secuencia adaptadora, para poder realizar la secuenciación en Illumina MiSeq, lo cual fue verificado en geles de agarosa al 2%, antes de enviar las muestras para la posterior adición de indicadores únicos a cada amplicón, en la Clínica Universitaria de Magdeburg, Alemania.

Las muestras secadas en etanol y acetato de sodio, como propuso Sambrook (1989) y de acuerdo a (Calderón *et al.*, 2018), es un método eficaz para concentrar ácidos nucleicos. En la literatura se han propuesto distintos métodos de concentración y entre los más populares se encuentra el utilizado en este estudio con etanol y el otro es el que utiliza isopropanol. El ADN es menos soluble en isopropanol, por lo que precipita más rápido incluso a bajas concentraciones. Sin embargo, la desventaja es que la sal también precipitará en isopropanol. Con el etanol, el ADN debe estar en una concentración más alta para flocular, pero la sal tiende a mantenerse soluble, incluso a temperaturas más frías (Owczarzy *et al.*, 2004).

El papel de la sal es neutralizar la carga de la cadena principal de fosfato de azúcar del ADN, esto hace que la molécula sea menos hidrófila (menos soluble en agua), por otra parte, el etanol tiene una constante dieléctrica más baja que el agua, por lo que se usa para promover enlaces iónicos entre el  $\text{Na}^+$  (de la sal) y el  $\text{PO}_3^-$  (de la estructura del ADN), lo que hace que el ácido nucleico precipite. En sal baja, un ADN dado se derretirá a una temperatura más baja que a una concentración de sal más alta; esto se debe a que el ADN es una molécula polianiónica. La sal "protege" las cargas negativas de cada fosfato (Owczarzy *et al.*, 2004; Singh y Singh, 2015; Tan y Chen, 2006); por lo tanto, el método con etanol tiende a resultar en ADN más puro e integro.

## VII. CONCLUSIONES

ZnSB50 y NiSB30 disminuyeron la fijación de  $N_2$  en el suelo, por lo cual se recomienda el uso de M-salfen en la forma B (con 2 hidroxilos en su estructura), independientemente del metal acoplado y la concentración aplicada, para disminuir concentraciones tóxicas de amonio cuando éste sobrepase el nitrato, esperando un periodo de respuesta de 60 días hasta ver su efecto. NiSB15 podría utilizarse como estimulador del último paso de la nitrificación en el suelo, incrementando la concentración de nitrato, el cual tiene importancia agronómica, igualmente en un periodo de respuesta de 60 días.

Antes de los 60 días no se vieron diferencias estadísticamente significativas en el amonio, nitrito, nitrato y pH entre tratamientos, por lo cual se infiere que la comunidad microbiana se mantuvo en un periodo de adaptación para desarrollar genes de resistencia ante la perturbación con los diferentes compuestos y catalizar el ciclo del nitrógeno llegados los 60 días, contribuyendo a la asimilación de M-salfen, así como de los metales que se pudieron haber encontrado naturalmente asociados a las partículas del suelo, por medio de la estimulación de sistemas de captación de níquel y zinc en las células microbianas. Basándonos en el incremento de ambos metales al final del estudio, M-salfen de níquel y zinc, independientemente de la forma y concentración, podrían ser candidatos para técnicas de biorremediación de sitios contaminados.

En todos los tratamientos, se puede elucidar la recuperación en el tiempo de los niveles de amonio, nitrito y nitrato a los 240 días. Con base en el cálculo de coeficientes canónicos y de componentes principales, podría decirse que al inicio del estudio tenemos un suelo en el que la amonificación se encuentra activa, para después incrementar la nitrificación en el medio, llegados los 240 días.

Se obtuvieron amplicones con la misma longitud esperada (~400 pb) para la región hipervariable V1-V2 del gen ARNr 16S, los cuales, después de añadidas las secuencias indicadoras, sirven para realizar la posterior secuenciación en Illumina MiSeq y, por consiguiente, analizar las secuencias de ADN obtenidas y conocer los microorganismos que se encuentran en cada una de las perturbaciones con M-salfen aplicadas, durante el tiempo.

## VIII. RECOMENDACIONES

Como aspectos futuros al presente trabajo, sería recomendable realizar una investigación relacionada con la diversidad de la microbiota presente encargada de transformar las formas de nitrógeno inorgánico en el suelo, por efecto de los compuestos salfen empleados. Para ello, se recomendaría realizar análisis de secuenciación masiva de siguiente generación (NGS), utilizando el secuenciador Illumina MiSeq, debido a que se ha construido la librería con los adaptadores específicos para esta plataforma y porque es ampliamente utilizada en la mayoría de los artículos publicados que emplean NGS en su metodología, lo cual conlleva a una mayor comparabilidad entre resultados. Aunado a lo anterior, técnicamente, esta plataforma es capaz de producir lecturas únicas de 100 bp, doblemente secuenciadas para una mejor precisión y genera cerca de 200 gigas de pares de bases (Gbp) por cada corrida, con una confiabilidad de 99.5% (Zhang *et al.*, 2011).

Una vez secuenciados los amplicones, se propone el análisis bioinformático utilizando el pipeline DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) con el objetivo de llevar a cabo el control de calidad y obtener las variantes únicas de secuencia (ASVs). Por consiguiente, también se propone realizar la clasificación taxonómica de las variantes resultantes, para posteriormente obtener la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la biocenosis bacteriana, para así, buscar las diferencias estadísticamente significativas que pudieran existir, por efecto de las perturbaciones realizadas con los compuestos M-salfen de níquel y zinc.

Si se requiere saber qué vías metabólicas se pudieron haber afectado en la comunidad bacteriana, en respuesta a la perturbación con los compuestos M-salfen aplicados, se puede realizar una predicción metagenómica mediante el análisis de las secuencias obtenidas, utilizando la base de datos PICRUSt, con un  $\alpha = 0.05$ .

Por último, se recomienda realizar un estudio *in situ* con los compuestos M-salfen de níquel y zinc, en suelo y en conjunción con el análisis de crecimiento de alguna planta de interés.



## IX. LITERATURA CITADA

- Abd-Karim, N. H., O. Mendoza, A. Shivalingam, A. J. Thompson, S. Ghosh, M. K. Kuimova, y R. Vilar. 2014. Salphen metal complexes as tunable G-quadruplex binders and optical probes. *The Royal Society of Chemistry* 4(7):3355–3363. doi:10.1039/C3RA44793F
- Ahemad, M. y M. Khan. 2011. Toxicological assessment of selective pesticides towards plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 58(3):169–187. doi:10.1556/amicr.58.2011.3.1
- Aislabe, J. y J. R. Deslippe. 2013. Soil microbes and their contribution to soil services. 143–161. En: Dymond, J. (Ed.), *Ecosystem services in New Zealand - conditions and trends*. Lincoln, New Zealand.
- Allison, S. D. y J. B. H. Martiny. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 105:11512–11519. doi:10.1073/pnas.0801925105
- Alloway, B. J. 2013. Sources of heavy metals and metalloids in soils 11–50 p. En: *Heavy Metals in Soils*. Springer, Dordrecht, Holanda. doi:10.1007/978-94-007-4470-7
- Ardestani, M. M., N. M. Van Straalen y C. A. M. Van Gestel. 2014. Uptake and elimination kinetics of metals in soil invertebrates: A review. *Environmental Pollution* 193:277–295. doi:10.1016/j.envpol.2014.06.026
- Aydin, M. E., S. Aydin, F. Beduk, A. Tor, A. Tekinay, M. Kolb y M. Bahadir. 2015. Effects of long-term irrigation with untreated municipal wastewater on soil properties and crop quality. *Environmental Science and Pollution Research* 22:19203–19212. doi:10.1007/s11356-015-5123-1
- Azarbad, H., C. A. M. Van Gestel, M. Niklińska, R. Laskowski, W. F. M. Röling y N. M. Van Straalen. 2016. Resilience of soil microbial communities to metals and additional stressors: DNA-based approaches for assessing “stress-on-stress” responses. *International Journal of Molecular Sciences* 17(6):1–20. doi:10.3390/ijms17060933
- Azarbad, H., M. Niklińska, R. Laskowski, N. M. van Straalen, C. A. M. van Gestel, J. Zhou, Z. He, C. Wen y W. F. M. Röling. 2015. Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *FEMS Microbiology Ecology* 91(1):1–11. doi:10.1093/femsec/fiu003
- Bader, N. R. 2010. Applications of schiff’s bases chelates in quantitative analysis: a review. *Rasayanjournal Chem* 3:660–670.
- Be´rard A., F. Rimet, Y., Capowiez y C. Leboulanger. 2004. Procedures for determining the pesticide sensitivity of indigenous soil algae – a possible bioindicator of soil contamination? *Arch Environ Contam Toxicol* 46:24–31. doi: 10.1007/s00244-003-2147-1

- Behera, S. N., M. Sharma, V. P. Aneja y R. Balasubramanian. 2013. Ammonia in the atmosphere: A review on emission sources, atmospheric chemistry and deposition on terrestrial bodies. *Environmental Science and Pollution Research* 20:8092–8131. doi:10.1007/s11356-013-2051-9
- Bellman, R. 1961. Adaptive control processes-a guided tour.
- Bender, E. A., T. J. Case y M. E. Gilpin. 1984. Perturbation Experiments in Community Ecology: Theory and Practice. *Ecological Society of America* 65:1–13.
- Birgé, H. E., C. R. Allen, S. G. Baer, D. H. Wall, R. A. Bevans y D. G. Angeler. 2016. Adaptive management for soil ecosystem services. *Journal of Environmental Management* 183:1–8. doi:10.1016/j.jenvman.2016.06.024
- Bracamonte-Sierra, A., B. E. Lara Enríquez y M. I. Borbón Almada. 1997. El desarrollo de la industria minera sonorense: el retorno a la producción de metales preciosos. *Región y Sociedad* 8(13–14):39–75. doi:10.22198/rys.1997.13-14.a1136
- Brevik, E. C., A. Cerdà, J. Mataix-Solera, L. Pereg, J. N. Quinton, J. Six y K. Van Oost. 2015. The interdisciplinary nature of SOIL. *SOIL Journal* 117–129. doi:10.5194/soil-1-117-2015
- Butterfield, S. M., P. R. Patel y M. L. Waters. 2002. Contribution of aromatic interactions to  $\alpha$ -helix stability. *Journal of the American Chemical Society* 124:9751–9755. doi:10.1021/ja026668q
- Cabello, P., M. D. Roldán y C. Moreno-Vivián. 2004. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* 150:3527–3546. doi:10.1099/mic.0.27303-0
- Calderón, K., A. Spor, M.-C. Breuil, D. Bru, F. Bizouard, C. Violle, R. L. Barnard y L. Philippot. 2017. Effectiveness of ecological rescue for altered soil microbial communities and functions. *The ISME Journal* 11(1):272. doi:10.1038/ismej.2016.86
- Calderón, K., L. Philippot, F. Bizouard, M. C. Breuil, D. Bru y A. Spor. 2018. Compounded disturbance chronology modulates the resilience of soil microbial communities and N-cycle related functions. *Frontiers in Microbiology* 9:1–11. doi:10.3389/fmicb.2018.02721
- Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson y S. P. Holmes. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13:581–583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Camarinha-Silva, A., R. Jáuregui, D. Chaves-Moreno, A. P. A. Oxley, F. Schaumburg, K. Becker, M. L. Wos-Oxley y D. H. Pieper. 2014. Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environmental Microbiology* 16(9):2939–2952. doi:10.1111/1462-2920.12362
- Campbell, N. H., N. H. A. Karim, G. N. Parkinson, M. Gunaratnam, V. Petrucci, A. K. Todd, R. Vilar y S. Neidle. 2012. Molecular basis of structure-activity relationships between salphen metal complexes and human telomeric DNA quadruplexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 55:209–222. doi:10.1021/jm201140v

- Cañizares-Villanueva, R. O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:131–143. doi:10.1016/j.procbio.2004.02.024
- Daims, H., E. V. Lebedeva, P. Pjevac, P. Han, C. Herbold, M. Albertsen, N. Jehmlich, M. Palatinszky, J. Vierheilig, A. Bulaev, R. H. Kirkegaard, M. Von Bergen, T. Rattei, B. Bendinger, P. H. Nielsen y M. Wagner. 2015. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature* 528(7583):504–509. doi:10.1038/nature16461
- Daims, H., S. Lücker y M. Wagner. 2016. A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology* 24:699–712. doi:10.1016/j.tim.2016.05.004
- Das, S., H. R. Dash y J. Chakraborty. 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:2967–2984. doi:10.1007/s00253-016-7364-4
- Daverey, A., Y. C. Chen, S. Sung y J. G. Lin. 2014. Effect of zinc on anammox activity and performance of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process. *Bioresource Technology* 165:105–110. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.034
- Dávila-Luna, J., R. E. Díaz-Caravantes, L. A. Navarro-Navarro y E. Romeo-Mendez. 2018. Tailings dams in the northwestern portion of the state of Sonora: A geographical approximation through remote sensing. *Investigaciones Geográficas* (97):18. doi:10.14350/rig.59624
- de la O-Villanueva, M., D. Meza-Figueroa, R. M. Maier, D. Moreno, A. Gómez-Alvarez, R. Del Río-Salas, H. Mendivil y A. Montijo. 2013. Procesos erosivos en jales de la presa I de Nacozari de García, Sonora y su efecto en la dispersión de contaminantes. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 65(1):27–38.
- Dechorgnat, J., C. T. Nguyen, P. Armengaud, M. Jossier, E. Diatloff, S. Filleur y F. Daniel-Vedele. 2011. From the soil to the seeds: The long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany* 62:1349–1359. doi:10.1093/jxb/erq409
- Díaz-Caravantes, R., H. Duarte-Tagles y F. M. Durazo-Gálvez. 2016. Health threats in the Sonora River: exploratory analysis of water quality reported in the official database of Mexico. *Revista de la Universidad Industrial de Santander* 27:123–126. doi:10.18273/revsal.v48n1-2016010
- Dominati, E. J. 2013. Natural capital and ecosystem services of soils. 132–142. En: J. Dymond (Ed.), *Ecosystem services in New Zealand - conditions and trends*. Lincoln, New Zealand.
- Dominati, E., M. Patterson y A. Mackay. 2010. A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics* 69(9):1858–1868. doi:10.1016/j.ecolecon.2010.05.002

- Dornelas, M. 2010. Disturbance and change in biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365:3719–3727. doi:10.1098/rstb.2010.0295
- Dzhardimalieva, G. I. y I. E. Uflyand. 2016. Metal Chelate Monomers as Precursors of Polymeric Materials. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 26:1112–1173. doi:10.1007/s10904-016-0418-3
- Epelde, L., J. M. Becerri, G. A. Kowalchuk, Y. Deng, J. Zhou y C. Garbisu. 2010. Impact of metal pollution and *Thlaspi caerulescens* growth on soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 76:7843–7853. doi:10.1128/AEM.01045-10
- Escárcega-Bobadilla, M. V., M. Martínez Belmonte, E. Martín, E. C. Escudero-Adán y A. W. Kleij. 2013. A recyclable trinuclear bifunctional catalyst derived from a tetraoxo bis-Zn(salphen) metalloligand. *Chemistry - A European Journal* 19:2641–2648. doi:10.1002/chem.201204132
- Escárcega-Bobadilla, M. V., Salassa, G., Martínez Belmonte, M., Escudero-Adán, E. C. y Kleij, A. W. 2012. Versatile switching in substrate topicity: Supramolecular chirality induction in di- and trinuclear host complexes. *Chemistry - A European Journal*, 18:6805–6810. doi: 10.1002/chem.201200335
- Etchebehere, C., C. Etchebehere, J. Tiedje y J. Tiedje. 2005. Presence of Two Different Active. *Microbiology* 71:5642–5645. doi:10.1128/AEM.71.9.5642
- FAO. 2009. Guía para la descripción de suelos. 1-100 p. Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación.
- Forster, O. M. 1899. Influence of Substitution on Specific Rotation in Bornylamine Series. 934–995. Pittsburg, Estados Unidos: University of Pittsburgh.
- Freedman, B. y Hutchinson, T. C. 1981. Sources of metal and elemental contamination of terrestrial environments, 35-94 p. En: *Effect of heavy metal pollution on plants*. Springer, Dordrecht, Holanda. doi: 10.1007/978-94-009-8099-0\_2
- Fuchsman, C. A., R. E. Collins, G. Rocap y W. J. Brazelton. 2017. Effect of the environment on horizontal gene transfer between bacteria and archaea. *PeerJ* 2017:1–26. doi:10.7717/peerj.3865
- Fuks, G., M. Elgart, A. Amir, A. Zeisel, P. J. Turnbaugh, Y. Soen y N. Shental. 2018. Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome* 6:1–13. doi:10.1186/s40168-017-0396-x
- Gadd, G. M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122:109–119. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.002
- Galán-Huertos, E. y A. Romero Baena. 2008. Contaminación de suelos por metales pesados. *Sociedad española de mineralogía* 10:48–60.
- Giller, K. E., E. Witter y S. P. Mcgrath. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1389–1414. doi:10.1016/S0038-0717(97)00270-8

- Goldberg, D. E. 2013. Fundamentals of Chemistry, 1689-1699 p. En: Journal of Chemical Information and Modeling. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- González-Flores, E., M. A. Tornero-Campante, E. Sandoval-Castro, A. Pérez-Magaña y A. J. Gordillo-Martínez. 2011. Biodisponibilidad y fraccionamiento de metales pesados en suelos agrícolas enmendados con biosólidos de origen municipal. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 27:291–301.
- González-García, J. 2013. Química de coordinación catiónica y aniónica de nuevos poliazareceptores politópicos 385. Universidad de Valencia.
- Griffiths, B. S. y L. Philippot. 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews* 37:112–129. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x
- Guo, F., F. Ju, L. Cai y T. Zhang. 2013. Taxonomic Precision of Different Hypervariable Regions of 16S rRNA Gene and Annotation Methods for Functional Bacterial Groups in Biological Wastewater Treatment. *PLOS ONE* 8:1-11. doi:10.1371/journal.pone.0076185
- Gupta, K. C. y A. K. Sutar. 2008. Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews* 252:1420–1450. doi:10.1016/j.ccr.2007.09.005
- Gürsoy, O. y M. Can. 2019. Hypervariable Regions in 16S rRNA Genes for the Taxonomic Classification. *Southeast Europe Journal of Soft Computing* 8:16–19.
- Hamady, M., J. J. Walker, J. K. Harris, N. J. Gold y R. Knight. 2008. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods* 5:235–237. doi:10.1038/nmeth.1184
- Hartmann, M., B. Frey, J. Mayer, P. Mäder y F. Widmer. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal* 9:1177–1194. doi:10.1038/ismej.2014.210
- Hastie, T., R. Tibshirani y J. Friedman. 2017. The elements of statistical learning: Data mining, Inference and Prediction 27: 83-85. Springer Series in Statistics.
- He, Z. L., X. E. Yang y P. J. Stoffella. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19:125–140. doi:10.1016/j.jtemb.2005.02.010
- Hirsch, P. R. y T. H. Mauchline. 2015. The Importance of the Microbial N Cycle in Soil for Crop Plant Nutrition. En *Advances in applied microbiology* 93:45-71. doi:10.1016/bs.aambs.2015.09.001
- Horikoshi, M. y Y. Tang. 2015. ggfortify: Data Visualization Tools for Statistical Analysis Results. R Project.
- Hu, H. W. y J. Z. He. 2017. Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments* 17:2709–2717. doi:10.1007/s11368-017-1851-9

- Hunter, C. A. y J. K. M. Sanders. 1990. The Nature of  $\pi$ - $\pi$  Interactions. *Journal of the American Chemical Society* 112:5525–5534. doi:10.1021/ja00170a016
- Husnik, F. y J. P. McCutcheon. 2018. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology* 16:67–79. doi:10.1038/nrmicro.2017.137
- Illumina. 2013. High-Speed, Multiplexed 16S Amplicon Sequencing on the MiSeq® System. Illumina Instructions.
- Illumina. 2013a. 16S Metagenomic Sequencing Library. Illumina.com 1–28. Recuperado de [http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)
- Insam, H. y M. S. A. Seewald. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils* 46:199–213. doi:10.1007/s00374-010-0442-3
- ISO. 2005. Soil quality — Determination of pH. Reference number: 10390:2005(E)
- Isobe, K. y N. Ohte. 2014. Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. *Microbes and Environments* 29:4–16. doi:10.1264/jsme2.ME13159
- Jafarian, M., M. Rashvand Avei, M. Khakali, F. Gobal, S. Rayati y M. G. Mahjani. 2012. DFT and experimental study of the host-guest interactions effect on the structure, properties, and electro-catalytic activities of N 2O 2-Ni(II) schiff-base complexes incorporated into zeolite. *Journal of Physical Chemistry C* 116:18518–18532. doi:10.1021/jp305370m
- James, G., D. Witten, T. Hastie y R. Tibshirani. 2013. An Introduction to Statistical Learning with Applications in R. 1-618. En: Springer Texts in Statistics. doi:10.1016/j.peva.2007.06.006
- Jorgensen, N. O. G. 2009. Organic Nitrogen. *Textbook of Clinical Occupational and Environmental Medicine* 1031–1042. doi:10.1016/b978-0-7216-8974-6.50046-4
- Kameoka, Y. y R. L. Pigford. 1977. Absorption of Nitrogen Dioxide into Water, Sulfuric Acid, Sodium Hydroxide, and Alkaline Sodium Sulfite Aqueous Solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals* 16:163–169. doi:10.1021/i160061a031
- Karlsson, R., A. Karlsson, O. Bäckman, B. R. Johansson y S. Hulth. 2009. Identification of key proteins involved in the anammox reaction. *FEMS Microbiology Letters* 297:87–94. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01677.x
- Keeney, D. R. y D. W. Nelson, 1982. Nitrogen- Inorganic Forms. 643-693 p. En: A. L. Page (eds) *Methods of Soil Analysis*, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, Estados Unidos.
- Khan, M., A. Mahmood y H. Z. Alkhatlan. 2016. Characterization of leaves and flowers volatile constituents of *Lantana camara* growing in central region of Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry* 9:764–774. doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.005

- Killham, K. 2011. Integrated soil management - Moving towards globally sustainable agriculture. *Journal of Agricultural Science* 149:29–36. doi:10.1017/S0021859610000845
- Kosolapov AB, Tsybul'ko EI, Makarova EV, Cherevach EI .2004. Use of the syrup prepared on the basis of wild-growing grasses of the Far East, in preventive maintenance of respiratory diseases and microelementosa at children. *Vopr Pitan* 73: 21-24.
- Kumar, S., D. N. Dhar y P. N. Saxena. 2009. Applications of metal complexes of Schiff bases- A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 68:181–187.
- Lee, P. Y., J. Costumbrado, C.-Y. Hsu y Y. H. Kim. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62:1–5. doi:10.3791/3923
- Leon-García, G., D. M. Meza-figueroa, J. L. Valenzuela-García, M. A. Encimas-Romero, A. I. Villalba-Atondo, K. K. Encinas-Soto y A. Gómez-Álvarez. 2018. Study of heavy metal pollution in arid and semi- arid regions due to mining activity : Sonora and Bacanuchi Rivers. *International Journal of Environmental Sciences and Natural Resources* 11(1):1–11. doi:10.19080/IJESNR.2018.10.555804
- Leung, A. C. W. y M. J. MacLachlan. 2007. Schiff base complexes in macromolecules. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 17:57–89. doi:10.1007/s10904-006-9092-1
- Lewis, G. N. 1916. The atom and the molecule. *Journal of the American Chemical Society* 38:762–785. doi:10.1021/ja02261a002
- Li, J., W. Tan, K. Wang, D. Xiao, X. Yang, X. He y Z. Tang. 2005. Ultrasensitive Optical DNA Biosensor Based on Surface Immobilization of Molecular Beacon by a Bridge Structure. *Analytical Sciences* 17:1149–1153. doi:10.2116/analsci.17.1149
- Liu, Y. y N. Von Wirén. 2017. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 68:2581–2592. doi:10.1093/jxb/erx086
- Lourenço, K. S., A. K. A. Suleiman, A. Pijl, J. A. van Veen, H. Cantarella y E. E. Kuramae. 2018. Resilience of the resident soil microbiome to organic and inorganic amendment disturbances and to temporary bacterial invasion. *Microbiome* 6:1–12. doi:10.1186/s40168-018-0525-1
- Lovley, D. R., D. E. Holmes y K. P. Nevin. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. En *Advances in Microbial Physiology* 49:2019-286. doi:10.1016/S0065-2911(04)49005-5
- Manouchehri, N. y A. Bermond. 2009. EDTA in Soil Science: A Review of Its Application in Soil Trace Metal Investigations. *Terrestrial and Aquatic Environmental Technology* 3:1–15.

- Marrero-Coto, J., A. Díaz-Valdivia y O. Coto-Pérez. 2010. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 41:67–78. doi:10.1007/s10534-013-9633-3
- Martínez-Espinosa, R. M., J. A. Cole, D. J. Richardson y N. J. Watmough. 2011. Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions* 39:175–178. doi:10.1042/bst0390175
- Martínez-Yrizar, A., R. Felger y A. Búrquez. 2010. Los ecosistemas terrestres: un diverso capital natural. 129–156 p. En: *Diversidad Biológica de Sonora*. Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Martinez, C. R. y B. L. Iverson. 2012. Rethinking the term “pi-stacking”. *Chemical Science* 3:2191–2201. doi:10.1039/c2sc20045g
- Mazlan, N. F., L. L. Tan, N. H. A. Karim, L. Y. Heng y M. I. H. Reza. 2016. Optical biosensing using newly synthesized metal salphen complexes: A potential DNA diagnostic tool. *Sensors and Actuators B: Chemical* 242:176–188. doi:10.1016/j.snb.2016.11.032
- McLean, J. E. y B. E. Bledsoe. 1992. Behavior of Metals in Soils. Office of Research and Development EPA 1–25. doi:10.1056/NEJMoa030660
- Mendiburu, F. y R. Simon. 2007. *Agricolae* - a free statistical library for agricultural research. R project.
- Meyer, M. y M. Kircher. 2010. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols* 5:10. doi:10.1101/pdb.prot5448
- Miller, A. J., X. Fan, M. Orsel, S. J. Smith y D. M. Wells. 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58:2297–2306. doi:10.1093/jxb/erm066
- Morawska-Płoskonka, J. y M. Niklińska. 2013. Effects of soil moisture and nickel contamination on microbial respiration rates in heavy metal-polluted soils. *Polish Journal of Environmental Studies* 22(5):1411–1418.
- Mortvedt, J. J. y J. D. Beaton. 1995. Heavy metal and radionuclide contaminants in phosphate fertilizers. *Scope-scientific Committee on Problems of the Environment International Council of Scientific Unions* 54:93-106.
- Narsilio, G. A. y C. Santamarina. 2008. Prácticas actuales y recomendaciones. *Georgia Institute of Technology* 2:18.
- Nelson, M. B., A. C. Martiny y J. B. H. Martiny. 2016. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:8033–8040. doi:10.1073/pnas.1601070113
- Nicholson, F. A., K. C. Jones y A. E. Johnston. 1994. Effect of Phosphate Fertilizers and Atmospheric Deposition on Long-Term Changes in the Cadmium Content of Soils and Crops. *Environmental Science and Technology* 28:2170–2175. doi:10.1021/es00061a027



- Norton, J. M. y J. M. Stark. 2010. Regulation and measurement of nitrification in terrestrial systems. *Methods in Enzymology* 486:343–368. doi:10.1016/B978-0-12-381294-0.00015-8
- Ojuederie, O. B. y O. O. Babalola. 2017. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14:26. doi:10.3390/ijerph14121504
- Oksanen, J. 2013. *Vegan: ecological diversity*. R Project.
- Olaniran, A. O., A. Balgobind y B. Pillay. 2013. Bioavailability of heavy metals in soil: Impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 14:10197–10228. doi:10.3390/ijms140510197
- Oves, M., S. Khan M, Q. Huda, M. Nadeen-Felemban, y T. Almeebi. 2016. Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 07:1:15. doi:10.4172/2155-6199.1000334
- Owczarzy, R., Y. You, B. G. Moreira, J. A. Manthey, L. Huang, M. A. Behlke y J. A. Walder. 2004. Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures. *Biochemistry* 43:3537–3554. doi:10.1021/bi034621r
- Parker, R. L. y M. Fleischer. 1967. Composition of the earth's crust. 19 p. En: M. Fleischer (Ed.), *Data of Geochemistry*, Washington, DC, Estados Unidos.
- Pérez-Rodríguez, P., E. de Blas, B. Soto, X. Pontevedra-Pombal y J. E. López-Periago. 2011. El conflicto de uso del suelo y la calidad de los alimentos. *CyTA - Journal of Food* 9:342–343. doi:10.1080/19476337.2011.615944
- Philippot, L., A. Spor, C. Hénault, D. Bru, F. Bizouard, C. M. Jones, A. Sarr y P.A. Maron. 2013. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal* 7(8):1609–1619. doi:10.1038/ismej.2013.34
- Puga, S., M. Sosa, T. Lebgue y C. Quintana. 2006. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada* 5:149–155.
- Raja-Rajeswari, T. y N. Sailaja. 2014. Impact of heavy metals on the environment. *Chemical and Pharmaceutical Sciences* 94:247. doi:10.1016/0300-483x(94)90042-6
- Ramasamy, K., Kamaludeen y S. P. Banu. 2007. Bioremediation of metals: microbial processes and techniques. *Environmental Bioremediation Technologies* 173–187. doi:10.1007/978-3-540-34793-4\_7
- Rebouças, J. S., E. L. S. Cheu, C. J. Ware, B. R. James y K. A. Skov. 2008. Synthetic and mechanistic aspects of a new method for ruthenium-metalation of porphyrins and Schiff-bases. *Inorganic Chemistry* 47:7894–7907. doi:10.1021/ic800616q
- Redeker, K. R., A. J. Baird y Y. A. Teh. 2015. Quantifying wind and pressure effects on trace gas fluxes across the soil-atmosphere interface. *Biogeosciences* 12:7423–7434. doi:10.5194/bg-12-7423-2015

- Rocamora, I. N., C. G. Porto, L. P. Alonso y F. Navarro-García. 2015. Uso de lodos de depuradora en agricultura: patógenos y resistencias a antibióticos. *Rev. salud ambient.* 15:113–120.
- Rosswall, T. 1982. Microbiological regulation of the biogeochemical nitrogen cycle. *Plant and Soil* 67:15–34. doi:10.1007/BF02182752
- Sadava, D., D. M. Hillis, H. C. Heller y M. R. Berenbaum. 2011. *Life: the science of biology.* 1266 p. En: Sinauer Associates, Inc. (9th ed.). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Sandhu, H. S., S. D. Wratten y R. Cullen. 2010. Organic agriculture and ecosystem services. *Environmental Science and Policy* 13:1–7. doi:10.1016/j.envsci.2009.11.002
- Schmidt, R., D. W. Etalo, V. de Jager, S. Gerards, H. Zweers, W. de Boer y P. Garbeva. 2016. Microbial small talk: Volatiles in fungal-bacterial interactions. *Frontiers in Microbiology* 6:1–12. doi:10.3389/fmicb.2015.01495
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana Nom-021-Semarnat-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. 85 pp. Diario Oficial de La Federación.
- SEMARNAT. 2006. Manual de Técnicas de Análisis de Suelos Aplicadas a la Remediación de Sitios Contaminados. 180 pp. Instituto Nacional de Ecología, Ciudad de México, México.
- SEMARNAT. 2007. NORMA Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio 1-69. Diario Oficial de la Federación.
- SEMARNAT. 2014. La degradación de suelos en México. Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales. Indicadores clave y de desempeño ambiental 119–154. doi:978-607-8246-61-8
- Servicio Geológico Minero. 2018. Panorama minero del estado de Sonora. En: Panorama Minero de los Estados. Secretaria de Economía.
- Shade, A., H. Peter, S. D. Allison, D. L. Baho, M. Berga, H. Bürgmann, D. H. Huber, S. Langenheder, J. T. Lennon, J. B. H. Martiny, K. L. Matulich, T. M. Schmidt y J. Handelsman. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology* 3(DEC):1–19. doi:10.3389/fmicb.2012.00417
- Shui, X., M. Peek, L. Lipscomb, Q. Gao, C. Ogata, B. Roques, C. Garbay-Jaureguiberry, A. Wilkinson y L. Williams. 2012. Effects of Cationic Charge on Three-Dimensional Structures of Intercalative Complexes Structure of a bis-Intercalated DNA Complex Solved by MAD Phasing. *Current Medicinal Chemistry* 7:59–71. doi:10.2174/0929867003375470
- Singh, A. y N. Singh. 2015. Effect of salt concentration on the stability of heterogeneous DNA. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 419:328–334. doi:10.1016/j.physa.2014.10.029

- Smil, V. 2000, marzo 27. Feeding the World: A Challenge for the Twenty-First Century. doi:10.7551/mitpress/2977.001.0001
- Smith, P., O. Andrén, B. Lijbeert, L. Dangerfield, M. Dangerfield, K. Ekschmitt, P. Lavelle y K. Tate. 1998. Soil Biota and Global Change. Soil biota and global change at the ecosystem level: describing soil biota in mathematical models. *Global Change Biology* 4(October):773–784 ST-Soil Biota and Global Change. Soil b. doi:10.1046/j.1365-2486.1998.00193.x
- Sobecky, P. A. y J. M. Coombs. 2009. Horizontal Gene Transfer in Metal and Radionuclide Contaminated Soils. En: M. B. Gogarten, J. P. Gogarten, y L. C. Olendzenski (Eds.), *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux* pp. 455–472. doi:10.1007/978-1-60327-853-9\_26
- Solano-Marín, A. M. 2005. Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc 141–190.
- Spain, A. y E. Alm. 2003. Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Rev. Undergrad. Res.* 2:1–6.
- Springael, D. y E. M. Top. 2004. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends in Microbiology* 12:53–58. doi:https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.12.010
- Stein, L. Y. y M. G. Klotz. 2016. The Nitrogen Cycle. *Current Biology* 26:205–237. doi:https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021
- Su, H., Y. Cheng, R. Oswald, T. Behrendt, I. Trebs, F. X. Meixner, M. O. Andreae, P. Cheng, Y. Zhang y U. Pöschl. 2011. Soil nitrite as a source of atmospheric HONO and OH radicals. *Science* 333(6049):1616–1618. doi:10.1126/science.1207687
- Taghipour, H., M. Mosaferi, M. Pourakbar y F. Armanfar. 2012. Heavy Metals Concentrations in Groundwater Used for Irrigation. *Health Promotion Perspectives* 2:205–210.
- Tan, Z. J. y S. J. Chen. 2006. Nucleic acid helix stability: Effects of salt concentration, cation valence and size, and chain length. *Biophysical Journal* 90:1175–1190. doi:10.1529/biophysj.105.070904
- Tarselli, M. A. 2012. Life and death with nitrogen. *Nature Chemistry* 4:686–686. doi:10.1038/nchem.1419
- Tchounwou, P. B., C. G. Yedjou, A. K. Patlolla y D. J. Sutton. 2013. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *NIH* 47:47-5683-47–5683. doi:10.5860/choice.47-5683
- Terenzi, A., C. Ducani, L. Male, G. Barone y M. J. Hannon. 2013. DNA interaction of CuII, NiII and ZnII functionalized salphen complexes: studies by linear dichroism, gel electrophoresis and PCR. *Dalton Trans.* 42:11220–11226. doi:10.1039/C3DT51090E
- Thomas, F. 2016. Ligand-centred oxidative chemistry in sterically hindered salen complexes: an interesting case with nickel. *Dalton Trans.* 45:10866–10877. doi:10.1039/C6DT00942E

- Tilman, D., J. Fargione, B. Wolff, C. D'Antonio, A. Dobson, R. Howarth, D. Swackhamer. 2001. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science* 292:281–284. doi:10.1126/science.1057544
- Tilman, D., K. G. Cassman, P. A. Matson, R. Naylor y S. Polasky. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671–677. doi:10.1038/nature01014
- Toribio-Jiménez, J., A. Ayala-Sanchez, J. C. Ruvalcaba-Ledezma, O. Talavera-Mendoza, Y. Romero-Ramirez, G. Torres-Ramos, D. A. Santana-Flores, M. L. Ramírez-Castillo, M. L. Arena-Ortiz y X. Chiappa-Carrera. 2017. Bacterias metalorresistentes para la biorremediación de suelos y jales mineros. 122–138. En: Salazar, M. A. (Ed.), *Microbiología ambiental en México: Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad*. Mérida, Yucatán, México: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).
- van der Putten, W. H. y D. H. Wall. 2018. Ecosystem Services Provided by Soil Life. *Routledge Handbook of Ecosystem Services* 415–420. doi:10.4324/9781315775302-36
- van Kessel, M. A. H. J., D. R. Speth, M. Albertsen, P. H. Nielsen, H. J. M. Op Den Camp, B. Kartal, M. S. M. Jetten y S. Lüscher. 2015. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 5. doi:10.1038/nature16459
- van Nes, E. H. y M. Scheffer. 2007. Slow Recovery from Perturbations as a Generic Indicator of a Nearby Catastrophic Shift. *The American Naturalist* 169:738–747. doi:10.1086/516845
- van Straalen, N. M. 2002. Assessment of soil contamination—a functional perspective. *Biodegradation* 13:41–52. doi:https://doi.org/10.1023/A:1016398018140
- Villalba-Atondo, A. I., J. M. Del Castillo Alarcón, A. Gómez Álvarez, A. M. Pérez Villalba, G. Nubes Ortiz y A. Salcido Esquer. 2013. Contaminación del agua y suelo en el ecosistema Río Agua Prieta, Sonora, México. *Biocencia* 15:1-3. doi:10.18633/bt.v15i1.129
- Ward, B. B. y M. M. Jensen. 2014. The microbial nitrogen cycle. *Frontiers in Microbiology* 10(11):2903–2909. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01786.x
- Weisany, W., Y. Raeli y K. H. Allahverdipoor. 2013. Role of Some of Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. *Bepls* 2:77–84. doi:10.5702/massspectrometry.A0032
- Whalen, J. K. 2014. Managing Soil Biota-Mediated Decomposition and Nutrient Mineralization in Sustainable Agroecosystems. *Advances in Agriculture* 2014:13. doi:10.1155/2014/384604
- Whiteoak, C. J., G. Salassa y A. W. Kleij. 2012. Recent advances with  $\pi$ -conjugated salen systems. *Chem. Soc. Rev.* 41(2):622–631. doi:10.1039/C1CS15170C
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 211 p. En: R. Gentleman, K. Hornik, y G. Parmigiani (Eds.), Springer. Houston, Texas, USA. doi:10.1007/978-3-319-24277-4

- Woese, C. R. y G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5088–5090. doi: 10.1073/pnas.74.11.5088
- Wood, D. W., J. C. Setubal, R. Kaul, D. E. Monks, J. P. Kitajima, V. K. Okura y E. W. Nester. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294(5550):2317–2323. doi:10.1126/science.1066804
- Wright, R. J., M. I. Gibson y J. A. Christie-Oleza. 2019. Understanding microbial community dynamics to improve optimal microbiome selection. *Microbiome* 7:1–14. doi:10.1186/s40168-019-0702-x
- Wu, M. L., M. C. F. Van Teeseling, M. J. R. Willems, E. G. Van Donselaar, A. Klingl, R. Rachel, W. J. C. Geerts, M. S. M. Jetten, M. Strous y L. Van Niftrik. 2011. Ultrastructure of the denitrifying methanotroph “*Candidatus methylomirabilis oxyfera*,” a novel polygon-shaped bacterium. *Journal of Bacteriology* 194(2):284–291. doi:10.1128/JB.05816-11
- Wurr-Rodak, B., A. Rodrigues dos Reis, F. de Barros Reis, T. Soares de Carvalho, D. Siqueira Freitas, J. Schulze, M. A. Carbone Carneiro y L. R. Guimarães Guilherme. 2018. Hidden Nickel Deficiency? Nickel Fertilization via Soil Improves Nitrogen Metabolism and Grain Yield in Soybean Genotypes. *Frontiers in Plant Science* 9(May):1–16. doi:10.3389/fpls.2018.00614
- Zaidi, A., M. Oves, E. Ahmad y M. S. Khan. 2011. Importance of Free-Living Fungi in Heavy Metal Remediation. 479–494 p. En: M. S. Khan, A. Zaidi, R. Goel, y J. Musarrat (Eds.), *Bio-management of Metal-Contaminated Soils*. Dordrecht, Holanda. doi:10.1007/978-94-007-1914-9\_21
- Zhang, J., R. Chiodini, A. Badr y G. Zhang. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics* 38:95–109. doi:doi:10.1016/j.jgg.2011.02.003
- Zhuang, W. R., Y. Wang, P. F. Cui, L. Xing, J. Lee, D. Kim, H. L. Jiang y Y. K. Oh. 2019. Applications of  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *Journal of Controlled Release* 294:311–326. doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.014