



# Evaluación del ciclo del nitrógeno en un suelo agrícola perturbado con compuestos Salfen de níquel y zinc

Evaluation of the nitrogen cycle in an agricultural soil disturbed with nickel-salphen and zinc-salphen compounds

Andrea Alicia López-Pacheco<sup>1</sup>, Martha Verónica Escárcega-Bobadilla<sup>2</sup>, Laura Mondragón-Camarillo<sup>3</sup>, Corina Hayano-Kanashiro<sup>1</sup>, Alejandro Varela-Romero<sup>1</sup>, Ramiro Vilchez-Vargas<sup>4</sup>, Kadiya Calderón<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), Edificio 7G, Blvd. Luis Donaldo Colosio S/N, Hermosillo, Sonora, C.P 83000, México.

<sup>2</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química UNAM. Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, CDMX, C.P 04510, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de Microbiología, UBIPRO, FES-Iztacala UNAM, Av. De los Barrios #1 Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. México, C.P. 54090, México

<sup>4</sup> Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Otto von Guericke University, Magdeburg, Leipziger Str. 44, Magdeburg C.P. 39120, Germany.

## 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 su estabilidad depende de perturbaciones bióticas o abióticas, como la contaminación por metales. Altas concentraciones de níquel (Ni) y zinc (Zn) en suelos agrícolas están relacionadas con prácticas agrícolas convencionales, composta, biosólidos, así como el riego con agua contaminada proveniente de la industria minera y termoeléctrica, principalmente. Con el objetivo de estudiar los efectos de dicha perturbación abiótica, se realizó un estudio a nivel microcosmos con suelo agrícola proveniente de la Costa de Hermosillo, Sonora, México, perturbado con compuestos M-salfen de Ni(II) y Zn(II), para evaluar su efecto en el funcionamiento del ciclo del nitrógeno a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos de los análisis espectrofotométricos de la reserva de nitrógeno inorgánico, de absorción atómica y de pH revelaron la recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno en 240 días posteriores a las perturbaciones con M-salfen aplicadas, sugiriendo que, la utilización de NiSB15 promueve el incremento de la concentración de nitrato a los 60 días y, en conjunción con NiSA15 aumenta la concentración de amonio en suelos agrícolas contaminados con metales pesados.

**Palabras clave:** Ni-salfen; Zn-salfen; suelo agrícola; ciclo del nitrógeno; perturbación abiótica.

## ABSTRACT

Soil ecosystem provides fundamental services as biogeochemical cycle regulation. Nitrogen cycle is managed by the microbiota that it harbors and depends on the stability of the ecosystem to cope abiotic disturbances such as metal and metalloid contamination. High concentrations of nickel (Ni) and zinc (Zn) in agricultural soils are frequently related to the application of conventional farming practices, composting, irrigation and biosolids deposit, as well as wastewater polluted from the mining and thermoelectric industry. To better

understand the effects of this kind of abiotic disturbance a microcosm, this study was performed with agricultural soil from the Coast of Hermosillo, Sonora, Mexico and contaminated with Ni (II) and Zn (II) salphen complexes to evaluate their effect on the system, regarding the nitrogen cycle fluxes over time. The results obtained by spectrophotometric analyzes of the inorganic nitrogen pool, atomic absorption and pH revealed that the soil system functioning based on the nitrogen cycle was recovered 240 days after disturbances with M-salphen. This suggest the potential use of NiSB15 as a promoter to increase nitrate concentration at 60 days in conjunction with NiSA15 to increase ammonium concentration in agricultural soils contaminated with heavy metals.

**Key words:** Ni-salphen; Zn-salphen; agricultural soil; N-cycle; abiotic disturbance.

## INTRODUCCIÓN

Los suelos son la base de todos los ecosistemas terrestres cuya gran biodiversidad se sustenta en una compleja red trófica donde se efectúa el intercambio de nutrientes (Aislabie y Deslippe, 2013). En los últimos años, el aumento de la población así como la actividad antropogénica ligada a la industrialización y urbanización, han generado gran cantidad de productos de desecho, los cuales han sido incorporados al agua y suelo, ocasionando modificaciones en los servicios ecosistémicos que este último provee (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2011; SEMARNAT, 2013; Cota-Ruiz *et al.*, 2019; Ochoa-Espinoza *et al.*, 2019). Los ciclos biogeoquímicos como el del nitrógeno, son de alta relevancia en la agricultura por su impacto económico y ecológico en el suelo; su buen funcionamiento ha sido traducido como un referente de la eficiente disponibilidad de los nutrientes por los microorganismos que colonizan el suelo y, por lo tanto, en una buena producción agrícola (Philippot *et al.*, 2013). Las perturbaciones abióticas o bióticas son fuertes impulsores de la dinámica ecosistémica del suelo que configura su trayectoria adaptativa con el tiempo y, por ende, la estabilidad

\*Autor para correspondencia: Kadiya Calderón  
Correo electrónico: kadiya.calderon@unison.mx

Recibido: 25 de octubre de 2019

Aceptado: 17 de enero de 2020

de su funcionamiento (Shade *et al.*, 2012; Calderón *et al.*, 2018; van der Putten y Wall, 2018). En este sentido, una parte de las perturbaciones abióticas está relacionada con la gran proporción de metales pesados que se introducen al suelo, los cuales se pueden definir como metales o metaloides (que tienen densidades  $\geq 5 \text{ g cm}^{-3}$ ) (Oves *et al.*, 2016). Dentro de los metales con mayor prevalencia en el suelo se encuentran el níquel (Ni) y el zinc (Zn), los cuales pueden localizarse adsorbidos en las partículas del suelo considerándoles como no biodisponibles o bien, en solución, de manera biodisponible para los microorganismos presentes (He *et al.*, 2005; Olaniran *et al.*, 2013). Además, dichos metales se encuentran como elementos traza en una gran cantidad de ambientes y su escasa o excesiva concentración puede afectar el desarrollo normal de las células que los requieren (Ardestani *et al.*, 2014; He *et al.*, 2005).

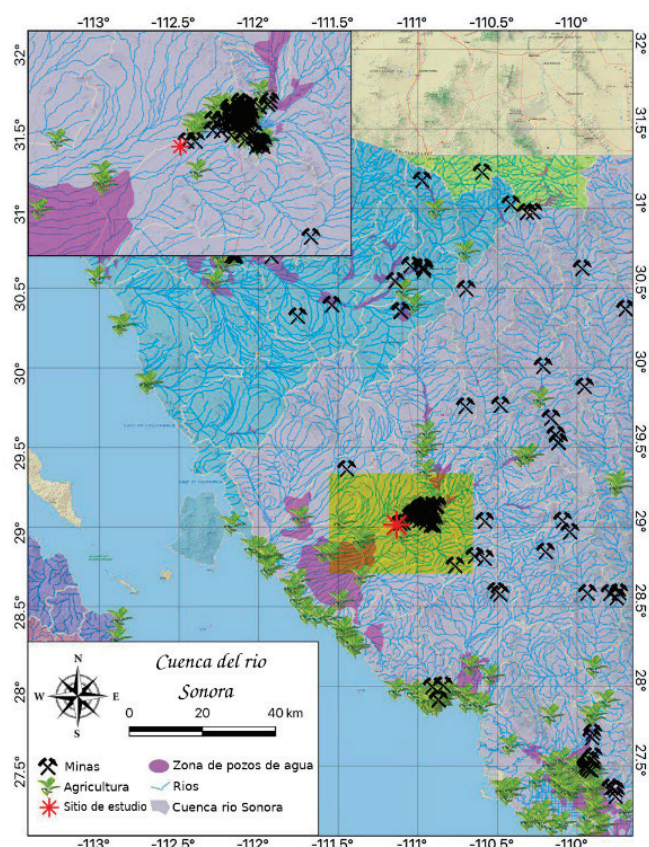
Estudios previos relacionados con dichos metales, han reportado su complejación con el fin de aumentar su biodisponibilidad y así promover el intercambio adecuado de nutrientes en el ecosistema (Shimazaki, 2013; Oves *et al.*, 2016). En este sentido, algunos quelatos, tales como los compuestos tipo M-salfen (originados a partir de la condensación de dos equivalentes de salicilaldehído con *o*-feniléndiamina), son considerados una clase muy importante de compuestos con amplias aplicaciones en aspectos como reacciones catalíticas bioinspiradas (Escárcega-Bobadilla *et al.*, 2013). Así mismo, este tipo de compuestos M-Salfen pueden aumentar su solubilidad en la matriz del suelo debido a la naturaleza de su estructura, la cual puede contener diversos grupos funcionales, como por ejemplo grupos hidroxilo, lo cual permite facilitar su incorporación por la microbiota presente eliminando así, las propiedades intrínsecas del suelo que pudieran impedir la asimilación eficaz del ion metálico por sí solo (Bader, 2010; Cano-Cruz, 2018). En estudios previos, se ha reportado que cuando el metal quelado es introducido en la célula microbiana, este puede participar en actividades como: (1) conformación de la estructura de proteínas y pigmentos, (2) procesos de oxidación-reducción, (3) regulación de la presión osmótica dentro de la célula manteniendo el balance iónico y (4) actuando como componente enzimático dentro del metabolismo de los organismos que los incorporan, pudiendo afectar de esta manera el ciclo natural de nutrientes que los microorganismos llevan a cabo (Kosolapov *et al.*, 2004; Zaidi *et al.*, 2011). En el presente trabajo los efectos provocados por una perturbación abiótica con diferentes compuestos M-salfen de níquel y zinc como acarreadores de iones metálicos fueron evaluados sobre la comunidad microbiana de un suelo agrícola en relación con su funcionamiento, utilizando como modelo las diferencias cuantitativas de amonio, nitrato y nitrito provenientes de las reacciones enzimáticas en el ciclo del nitrógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo de suelo y diseño experimental

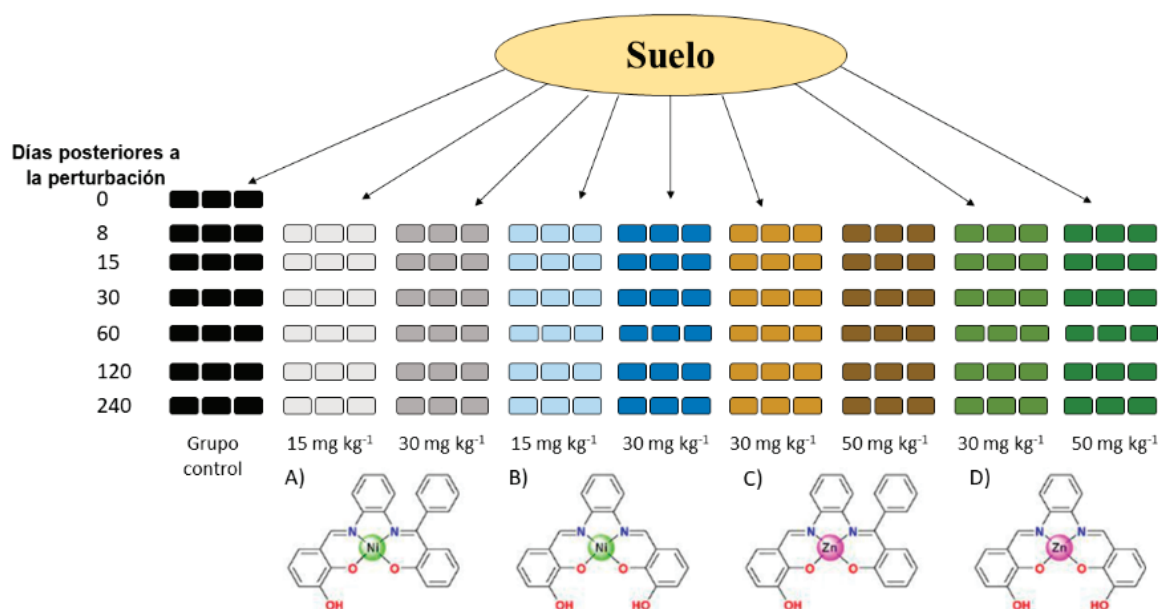
Se utilizó como modelo de estudio un sistema de microcosmos conformados por suelo agrícola provenien-

te de un campo 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 de 3 años de antigüedad, donde el uso de pesticidas fue nulo (Figura 1). Se tomaron 30 núcleos de muestras aleatorias de suelo separadas entre sí por un mínimo de 10 metros de distancia con un nucleador de 30 cm de profundidad (Calderón *et al.*, 2017). El suelo colectado fue mezclado y tamizado en una malla de 4 mm para crear una muestra compuesta. El suelo fue transportado al laboratorio de microbiología del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) donde se construyeron 164 microcosmos, los cuales consistieron en frascos de vidrio con tapón de algodón para permitir el intercambio gaseoso, ambos esterilizados previamente y 55 g del suelo previamente colectado (T0) (Calderón *et al.*, 2017). Posterior a ocho días de aclimatación en condiciones de laboratorio, tres microcosmos del lote total fueron sacrificados en condiciones de esterilidad para posteriores análisis fisicoquímicos, mientras que los microcosmos restantes fueron divididos en diferentes grupos; el primero de ellos comprendido por 18 microcosmos denominado como grupo control (Figura 2). El lote de microcosmos restantes fue perturbado en condicio-



**Figura 1.** 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.

**Figure 1.** Soil sampling site. Alfalfa (*Medicago sativa*) agricultural field in the Department of Agronomy and Livestock of the University of Sonora, located in the Hermosillo Coast, Sonora, México.



**Figura 2.** Diseño experimental. 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.

**Figure 2.** Experimental design. M-Salphen compounds of nickel and zinc. A) A form of Ni-Salphen (NiA) containing 4 benzenic rings and 1 hydroxyl group; B) B form of Ni-Salphen (NiB) containing 3 benzenic rings and 2 hydroxyl groups; C) A form of Zn-Salphen (ZnA) containing 4 benzenic rings and 1 hydroxyl group and D) B form of Zn-Salphen (ZnB) containing 3 benzenic rings and 2 hydroxyl groups.

nes de esterilidad con 2 formas diferenciadas de dos compuestos M-salfen distintos; níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) y zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), cada uno modificado a su vez por un grupo hidroxilo (OH) en su estructura (A), o dos grupos hidroxilos (B), respectivamente (Figura 2). Todos los compuestos M-salfen fueron sintetizados y caracterizados previamente en el laboratorio de Química Supramolecular de la Facultad de Química de la UNAM, (Hernández-Ramírez y Cano-Cruz, 2018). Los compuestos Ni-salfen y Zn-salfen en sus diferentes formas, fueron aplicados a dos diferentes concentraciones establecidas con base a los límites máximos permitidos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) para cada metal (McLean y Bledsoe, 1992). La forma A y B de Ni-salfen se aplicó en concentraciones de 15 y 30  $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo, respectivamente, denominados: NiSA15, NiSA30, NiSB15 y NiSB30; mientras que la forma A y B de zinc-salfen fue aplicada a 30 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo, respectivamente, denominados: ZnSA30, ZnSA50, ZnSB30 y ZnSB50 (Figura 2). Así, cada perturbación fue aplicada en grupos de 18 microcosmos al posterior a una semana de aclimatación. Todos los microcosmos fueron incubados a 25°C durante 240 días manteniendo un intervalo de capacidad de retención de agua (WHC) entre 60-80%, tomando como puntos de muestreo los días; 8 (T1), 15 (T2), 30 (T3), 60 (T4), 120 (T5) y 240 (T6) (Figura 2). Así, para cada punto de muestreo, tres microcosmos de cada tratamiento fueron sacrificados en condiciones de esterilidad ( $n=18 \times 6$ ) y el suelo contenido fue dividido para posteriores análisis físico-químicos como porcentaje de humedad, pH y análisis de la reserva de nitrógeno inorgánico y el resto, fue congelado a -20°C hasta su procesamiento para las determinaciones de absorción atómica de metales.

#### Determinación del porcentaje de humedad, textura y pH

La determinación del porcentaje de humedad del suelo proveniente de los microcosmos perturbados fue realizada siguiendo la norma ISO-10390:2005, utilizando 5 g de suelo. Así mismo, la determinación del pH en los diferentes puntos de muestreo se realizó utilizando un electrodo de vidrio en una suspensión de suelo (1:5) en agua, la cual tuvo una conductividad específica no superior a 0.2  $\text{mS m}^{-1}$  a 25°C y un pH superior a 5.6 (Grado 2 de agua según ISO 3696: 1987). La determinación de textura del suelo se realizó de acuerdo a la norma ISO 11277:2009.

#### Determinación de la reserva de nitrógeno inorgánico y su funcionalidad

Las concentraciones de amonio y nitrato reflejan el balance neto entre los flujos de nitrógeno presente en el suelo, resultado de diferentes procesos de transformación del mismo, es por ello que se siguió la metodología modificada descrita por Calderón *et al.* (2017), para cuantificación del funcionamiento general del ciclo del nitrógeno en el suelo. Para ello, la reserva mineral de nitrógeno fue extraída utilizando 15 g de suelo fresco, provenientes de cada microcosmo sacrificado, con 60 mL de una solución de KCl 1M y agitados durante 1 h a 80 rpm a temperatura ambiente para la posterior obtención de los filtrados, los cuales se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación. La cuantificación de la concentración de la reserva de nitrógeno inorgánico comprendida por amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) fue realizada por el método colorimétrico previamente descrito por Walkeley y Black (1934) y Keeny y Nelson (1982), utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Spectrophotometer 752 (Bio-Equip, China).

### Análisis de absorción atómica para la determinación de metales

La determinación del contenido de níquel y zinc se evaluó en los microcosmos provenientes de cada perturbación en los puntos de muestreo T1 y T6 (8 y 240 días, respectivamente). Además, el suelo sin ser sometido a ninguna perturbación (control) también fue analizado. Para ello, 10 g de suelo fueron previamente digeridos en un horno de microondas marca Anton Paar, modelo Multi WavePRO, empleando  $\text{HNO}_3$ . Para la calibración de la cuantificación se empleó un estándar certificado marca High-Purity Standards Cat QCS-27, Lote 1826134 y posteriormente las cuantificaciones fueron realizadas empleando un equipo de espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado, generado por microondas (MP-AES) marca Agilent modelo MPES 4200 en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química (UNAM).

### Análisis estadístico

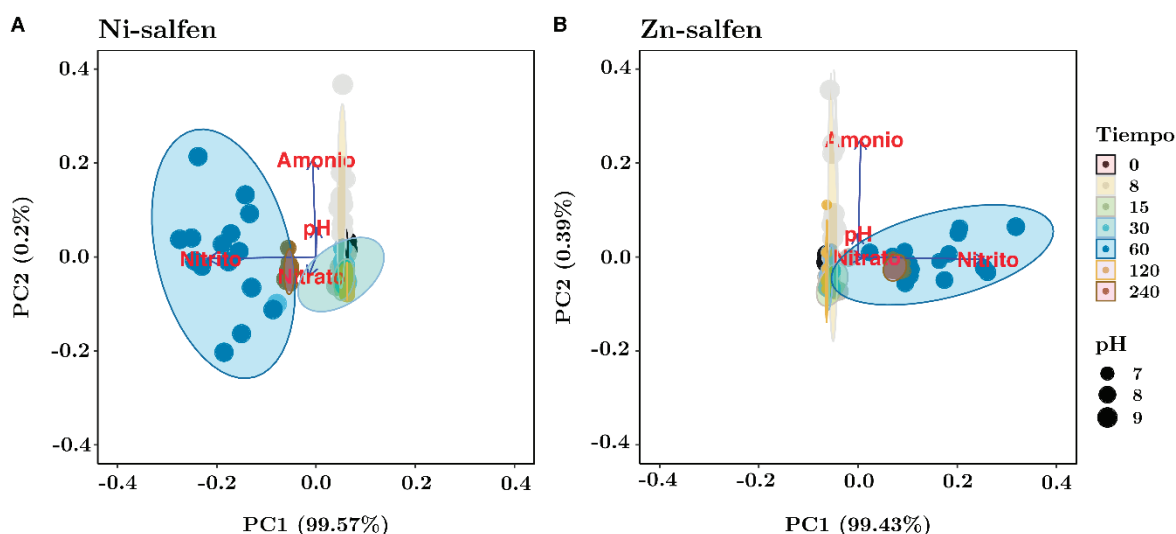
Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa R Studio (versión 3.6.1), utilizando los siguientes paquetes; ggplots2 (Wickham, 2016), *agricolae* (Mendiburu y Simon, 2009), ggfortify (Horikoshi *et al.*, 2019) y *vegan* (Oksanen *et al.*, 2008), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $\alpha=0.05$ ) seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey para la separación de medias. Se realizó también un análisis de coeficientes canónicos para determinar la recuperación en el tiempo de los tratamientos y un análisis multivariado de componentes principales (PCA) para comparar los diferentes perfiles.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Funcionalidad del ciclo del nitrógeno y movilización de níquel y zinc

El efecto causado por las perturbaciones aplicadas con las diferentes configuraciones de compuestos M-salfen sobre la reserva de nitrógeno inorgánico, reveló diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo y tratamiento aplicado ( $p<0.05$ ) (Figura 3 y Tabla 1). A los 8 días después de la perturbación, se observó un aumento de la concentración únicamente de amonio, como indicador de la reserva de nitrógeno inorgánico. Sin embargo, entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ); mientras que la concentración de nitrito y nitrato se mantuvo baja y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p<0.05$ ) (Tabla 1). Lo anterior podría deberse a que las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  como *Azotobacter* y *Bradyrhizobium*, así como las reductoras de nitrito con la enzima reductasa de asimilación de nitrito (sirohaem-Nir), se aclimataron en todos los microcosmos, ocasionando la acumulación del amonio (Cabello *et al.*, 2004; Isobe y Ohte, 2014; Daims *et al.*, 2016; Stein y Klotz, 2016).

A los 15 y 30 días posteriores a las perturbaciones, la reserva de amonio disminuyó en todos los tratamientos y no se observaron diferencias ( $p<0.05$ ) de pH entre tratamientos, observándose en promedio un pH de 9 los primeros 30 días (Tabla 1). Los primeros 60 días posteriores a las perturbaciones, posiblemente corresponden a un periodo de aparente estabilidad en los indicadores del ciclo del nitrógeno, donde los microorganismos que dirigen dicho ciclo se mantuvieron en un periodo de aclimatación ante los metales acoplados a M-salfen primeramente, transportando los metales dentro



**Figura 3.** Análisis de Componentes Principales (PCA) 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.

**Figure 3.** Principal Component Analysis (PCA) of treatments with M-Salphen of nickel and zinc including control, over time. A) Disturbed treatments with Ni-Salphen and control; B) Disturbed treatments with Zn-Salphen and control.

**Tabla 1.** Reserva de nitrógeno inorgánico y pH en los tratamientos perturbados con M-salfen de níquel y zinc. Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ),  $\pm sd = \pm$  desviación estándar

**Table 1.** Inorganic nitrogen reserve and pH in disturbed treatments with nickel and zinc M-Salphen. The letters denote statistically significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ),  $\pm sd = \pm$  standard deviation

Tratamiento	pH														
	8 días		15 días		30 días		60 días		Tukey test	120 días		240 días			
	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$		media	$\pm sd$	Tukey test	media	$\pm sd$	Tukey test
CONTROL	9.15	0.03	8.68	0.01	8.66	0.15	8.46	0.14	ab	7.33	0.06	c	7.69	0.07	a
NiSA15	8.89	0.29	8.75	0.01	8.76	0.08	8.46	0.11	ab	7.44	0.05	bc	7.67	0.04	a
NiSA30	8.98	0.13	8.74	0.01	8.62	0.10	8.55	0.12	ab	7.53	0.08	ab	7.54	0.11	ab
NiSB15	9.11	0.06	8.74	0.02	8.58	0.02	8.51	0.05	ab	7.62	0.03	a	7.59	0.04	a
NiSB30	9.13	0.13	8.75	0.01	8.60	0.04	8.61	0.09	a	7.50	0.07	ab	6.93	0.80	a
ZnSA30	9.08	0.05	8.68	0.10	8.60	0.03	8.25	0.18	b	7.11	0.08	e	7.71	0.06	a
ZnSA50	9.20	0.15	8.70	0.07	8.55	0.06	8.35	0.13	ab	7.09	0.05	e	7.78	0.02	a
ZnSB30	9.09	0.05	8.69	0.03	8.63	0.11	8.46	0.03	ab	7.18	0.08	de	7.64	0.06	a
ZnSB50	9.17	0.10	8.71	0.04	8.64	0.08	8.42	0.12	ab	7.31	0.06	cd	7.76	0.04	a

Concentración de Amonio (mg kg<sup>-1</sup>)

Tratamiento	Concentración de Amonio (mg kg <sup>-1</sup> )														
	8 días		15 días		30 días		60 días		Tukey test	120 días		240 días			
	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$		media	$\pm sd$	Tukey test	media	$\pm sd$	Tukey test
CONTROL	2.02	0.10	0.35	0.04	0.81	0.36	2.95	0.56	ab	0.82	0.06	ab	1.50	0.03	b
NiSA15	2.11	0.55	0.57	0.36	0.35	0.04	3.71	1.24	a	0.59	0.23	b	1.44	0.10	b
NiSA30	1.73	0.42	0.33	0.00	0.33	0.00	2.69	0.58	ab	0.60	0.19	b	1.52	0.18	ab
NiSB15	3.59	2.72	0.33	0.00	0.54	0.19	2.96	1.55	ab	0.61	0.06	b	1.63	0.22	ab
NiSB30	3.27	1.32	0.50	0.19	0.47	0.25	1.42	0.31	b	0.71	0.17	ab	1.52	0.20	ab
ZnSA30	3.66	2.32	0.40	0.13	0.42	0.08	2.45	0.59	ab	1.20	0.33	ab	1.84	0.04	a
ZnSA50	4.51	2.41	0.69	0.57	0.62	0.26	1.71	0.35	b	1.00	0.06	ab	1.61	0.16	ab
ZnSB30	2.98	3.33	0.42	0.17	0.33	0.00	1.82	0.34	b	0.85	0.25	ab	1.55	0.06	ab
ZnSB50	3.27	1.43	0.45	0.15	0.83	0.51	1.50	0.34	b	1.66	1.16	a	1.71	0.04	ab

Concentración de Nitrito (mg kg<sup>-1</sup>)

Tratamiento	Concentración de Nitrito (mg kg <sup>-1</sup> )														
	8 días		15 días		30 días		60 días		Tukey test	120 días		240 días			
	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$	media	$\pm sd$		media	$\pm sd$	Tukey test	media	$\pm sd$	Tukey test
CONTROL	2.79	0.84	3.73	1.35	1.79	0.40	59.71	13.11	ab	0.00	0.00	b	26.49	0.68	ab
NiSA15	1.93	1.49	0.52	0.72	11.21	18.25	68.58	2.36	a	0.00	0.00	b	27.17	1.39	ab
NiSA30	2.58	0.21	0.17	0.30	1.01	0.24	52.02	6.61	bcd	0.00	0.00	b	27.01	0.84	ab
NiSB15	2.43	0.41	0.21	0.27	1.12	0.89	57.37	11.65	ab	0.00	0.00	b	26.33	0.72	ab
NiSB30	2.57	0.55	1.87	1.74	0.32	0.48	41.81	7.33	bcd	0.00	0.00	b	25.65	0.35	b
ZnSA30	1.93	0.74	0.73	0.68	1.26	0.00	54.88	9.83	abc	0.36	0.23	a	27.86	1.26	ab
ZnSA50	2.43	1.39	3.43	4.71	1.00	0.44	27.54	8.88	d	0.00	0.00	b	29.55	1.84	a
ZnSB30	1.58	0.73	0.91	0.89	0.74	0.22	48.15	15.19	bcd	0.00	0.00	b	27.94	3.04	ab
ZnSB50	2.43	0.16	0.91	1.15	1.50	0.43	30.80	3.79	cd	0.00	0.00	b	27.46	0.90	ab

Concentración de Nitrato (mg kg<sup>-1</sup>)

Tratamiento	8 días		15 días		30 días		60 días			120 días			240 días		
	media	±sd	media	±sd	media	±sd	media	±sd	Tukey test	media	±sd	Tukey test	media	±sd	Tukey test
CONTROL	0.06	0.01	0.21	0.02	0.16	0.05	3.42	1.42	bc	0.00	0.00	c	1.14	0.12	ab
NiSA15	0.10	0.05	0.23	0.05	0.20	0.09	4.07	0.30	abc	0.07	0.04	bc	1.01	0.12	abc
NiSA30	0.03	0.01	0.23	0.04	0.21	0.02	2.67	0.55	bc	0.34	0.21	a	1.35	0.15	a
NiSB15	0.10	0.03	0.23	0.02	0.17	0.04	6.99	1.68	a	0.11	0.07	bc	0.63	0.52	c
NiSB30	0.07	0.04	0.23	0.00	0.16	0.03	5.42	1.25	ab	0.00	0.00	c	0.99	0.05	abc
ZnSA30	0.08	0.04	0.21	0.01	0.16	0.05	1.33	0.53	c	0.10	0.05	bc	0.70	0.12	bc
ZnSA50	0.08	0.03	0.61	0.68	0.26	0.06	1.97	1.87	c	0.21	0.03	ab	0.92	0.09	abc
ZnSB30	0.04	0.01	0.18	0.04	0.21	0.17	2.46	0.22	bc	0.12	0.10	abc	1.24	0.15	ab
ZnSB50	0.09	0.01	0.25	0.07	0.11	0.05	2.39	0.57	bc	0.26	0.08	ab	1.29	0.05	a

de la célula, posiblemente mediante el sistema de captura de magnesio *CorA*, el cual es rápido e inespecífico para metales como Co(II), Ni(II), Zn(II) y Mn(II), y es dependiente del gradiente quimiosmótico existente a través de la membrana citoplásmica (Spain, 2003; Azarbad *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2016).

A los 60 días posteriores a las perturbaciones se encontraron las mayores concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el suelo en todo el estudio. Así, la respuesta del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ante la perturbación con M-salfen, se diferenció entre tratamientos a los 60 días (p<0.05), en donde el compuesto NiSA15 mostró la mayor concentración (3.7 mg kg<sup>-1</sup> suelo) siendo diferente, significativamente (p<0.05), respecto a los tratamientos perturbados con NiSB30, ZnSA50, ZnSB30 y ZnSB50. El aumento en la acumulación de amonio pudo deberse al favorecimiento del desarrollo de bacterias y arqueas fijadoras de N<sub>2</sub>, así como a la baja proliferación de las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) (Daims *et al.*, 2016; Stein y Klotz, 2016). En estudios previos, Miller *et al.* (2007), demostraron que la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el suelo debería ser mínimo tres órdenes de magnitud menor que la concentración de nitrato, con el fin evitar una posible toxicidad en las raíces de las plantas. Aunado a lo anterior, la alta concentración de esta especie nitrogenada en el medio, puede aumentar la capacidad de intercambio catiónico saturando la reserva soluble de toda la reserva de nitrógeno en el suelo, ocasionando así una acumulación de nitrito y nitrato. Por otra parte, la acumulación de amonio en el sistema, puede provocar la inhibición del crecimiento de raíces y brotes que se asocian con la clorosis de las hojas y con desequilibrios iónicos en las plantas, así como la alteración de los gradientes de pH, causando acidificación a través de las membranas o causando estrés oxidativo (Liu y von Wirén, 2017). En el presente estudio se observó que, con el aumento en la concentración de amonio en el suelo, éste se acidifica pasando de un pH básico a neutro.

Respecto al NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, se observó una respuesta diferente estadísticamente significativa (p<0.05) entre los tratamientos NiSA15 y ZnSA50 (68.5 mg kg<sup>-1</sup> suelo y 27.5 mg kg<sup>-1</sup> suelo,

respectivamente). Este resultado se puede comparar con lo publicado por Nelson *et al.* (2016), quienes demostraron que, en la mayoría de los suelos agrícolas, independientemente del tipo de suelo y perturbación abiótica relacionada con el cambio de pH, temperatura, humedad, cuando existe una acumulación de nitrito, este puede deberse a que el primer paso de la desnitrificación ha sido estimulado.

Referente a la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el compuesto NiSB15 fue el que obtuvo la mayor concentración (6.9 mg kg<sup>-1</sup> suelo), siendo este tratamiento diferente significativamente (p<0.05) respecto al control y todos los tratamientos de Zn-salfen, independientemente de la forma y concentración. Los estudios previos, que han evaluado el efecto de la contaminación del suelo con Níquel como metal pesado en el ciclo del nitrógeno del suelo, han sido enfocados al proceso de fijación de N<sub>2</sub>, encontrando que, con la aplicación de solución nutritiva de NiCl<sub>2</sub> 1 mM, el suelo aumentó la actividad de hidrogenasa, enzima implicada en la fijación de nitrógeno de los nódulos de *Rhizobium japonicum*, 52 días después de la perturbación y excediendo la dosis del tratamiento control en aproximadamente un 45% para observar que, el efecto promotor desapareció en el día 100, aparentemente como resultado del aumento de la toxicidad del metal (Weisany *et al.*, 2013). En este sentido, en nuestro estudio, los resultados obtenidos con los compuestos NiSB30 y ZnSA30, demostraron de igual manera no presentar diferencias significativas de pH entre la mayoría de los tratamientos (p<0.05) (Tabla 1).

A los 120 días posteriores a las perturbaciones iniciales, se observó un panorama similar al ya observado en los días 15 y 30 en los tres indicadores de las especies nitrogenadas cuantificadas, resultando en una disminución significativa respecto a los 60 días del tratamiento. Respecto a la concentración de amonio, se observó una diferencia significativa entre los tratamientos de los compuestos NiSA15, NiSA30 y NiSB15 respecto a ZnSB50, siendo este último el de mayor concentración (1.6 mg kg<sup>-1</sup> suelo). Por otra parte, un efecto interesante se observó en todos los tratamientos comparado con el muestreo anterior (60 días), donde el nitrito fue consu-

mido casi en su totalidad, reduciéndose en aproximadamente 60%, sin embargo, la concentración de nitrato evaluada en este tiempo de muestreo demostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control para los tratamientos NiSA30, ZnSB50 y ZnSA50.

En lo que corresponde al pH, en este tiempo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control para todos los tratamientos excepto NiSA15 y ZnSB50, viéndose que NiSB15 mostró el mayor pH (7.6), por otra parte, ZnSA30 y ZnSA50, mostraron el menor potencial (7.1 y 7.0, respectivamente). 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 nitrito al medio (Daims *et al.*, 2016; Van Kessel *et al.*, 2015 y Hu y He, 2017), por lo tanto, la presencia de nitrato, pero no de nitrito, podría deberse a la presencia y desarrollo de este tipo de bacterias, agregando que se ha reportado que la nitrificación aumenta con la disminución de pH (Aislabie y Deslippe, 2013).

Al final del experimento, es decir, alcanzados los 240 días posteriores a las perturbaciones iniciales, el  $\text{NH}_4^+$  en todos los tratamientos mostró un aumento de concentración respecto a los muestreos anteriores de 60 y 120 días. A los 240 días las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) pudieron observarse en los microcosmos perturbados con el compuesto ZnSA30 respecto al control y NiSA15 (1.5  $\text{mg kg}^{-1}$  suelo y 1.4  $\text{mg kg}^{-1}$  suelo). La especie  $\text{NO}_2^-$  presentó un aumento en la concentración para todos los tratamientos respecto al del muestreo de 120 días. La cuantificación de nitrato a los 240 días fue mayor para todos los tratamientos respecto a los tiempos anteriores muestreados, excepto para los microcosmos muestreados a los 60 días, mostrando diferencias significativas entre los microcosmos perturbados con el compuesto NiSB15 y el control ( $p < 0.05$ ). El pH nuevamente no mostró diferenciación significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Al inicio del estudio en todos los tratamientos y el control se observó un intervalo de pH entre 9.2-8.9; mientras que a los 120 días el pH disminuyó dentro de un intervalo de 7.6-7.1, manteniéndose así hasta los 240 días, por lo que se observó un efecto en este parámetro de un suelo con pH básico a neutro para todos los tratamientos (Tabla 1). El pH es un factor muy importante que afecta la movilidad de los metales en la matriz del suelo (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 y Romero Baena, 2008).

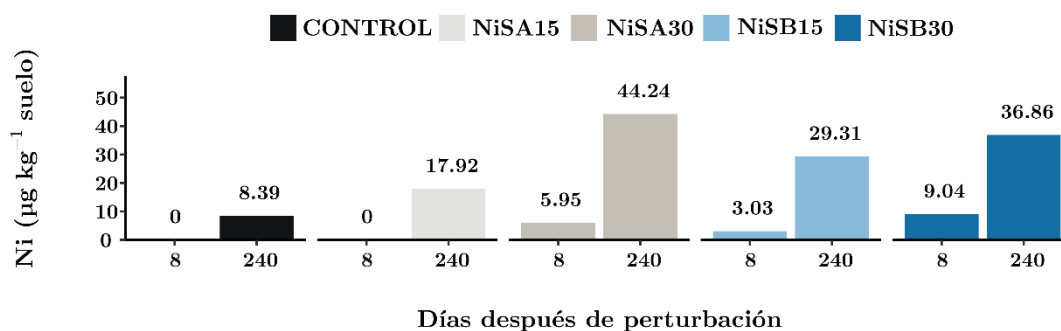
Los resultados de la cuantificación de los metales al inicio y final de los tratamientos mediante absorción atómica mostraron que, entre los tratamientos con Ni-salfen y el control, se tuvo un aumento en la concentración del metal entre los 8 y 240 días para todos los compuestos empleados con mayor contraste en NiSA30 a los 240 días (Figura 4A), sugiriendo una acumulación del níquel en el suelo. Así mismo, en los tratamientos con Zn-salfen, se observó que los tratamien-

tos con 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 sin embargo, la reducción de la concentración de metal no se alcanzó como en el control (Figura 4B), esto puede deberse a la disminución del pH, favoreciéndose la asimilación de compuestos metálicos en el suelo, incluyendo los aplicados y los que se encontraban naturalmente asociados a las partículas del suelo, al inducir la resistencia en la microbiota presente, por medio de la aparición de genes de resistencia (Galán Huertos y Romero Baena, 2008; Ojuederie y Babalola, 2017). De esta manera, 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 la última década, 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 (Khan *et al.*, 2016; Ojuederie y Babalola, 2017).

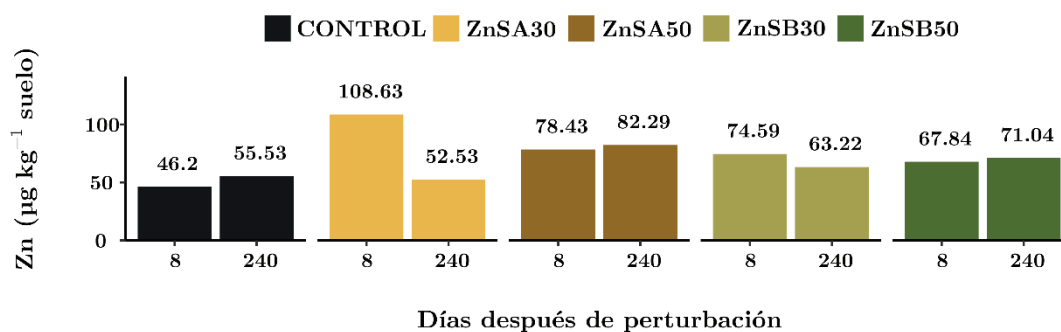
### Recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno

El análisis de coeficientes canónicos, mostrados en la Figura 5, muestra que la recuperación de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno a lo largo del estudio no fue lineal. A los 15 días posteriores a las perturbaciones, únicamente se observaron diferencias puntuales como la mostrada para el tratamiento ZnSA50 y, posteriormente, a los 30 días para NiSA15. Sin embargo, hasta los 60 días posteriores a la perturbación, los tratamientos fueron claramente diferenciados, mostrando una posible resistencia de la comunidad microbiana hasta los 60 días posteriores a las diferentes perturbaciones con los compuestos M-salfen. A los 120 días, que es el doble del tiempo anterior, se obtuvo un perfil similar de todos los tratamientos respecto al control y, finalmente, a los 240 días posteriores a la perturbación inicial, los tratamientos se diferenciaron entre sí con mayor contraste entre NiSB30 y ZnSA50, ambos respecto al control (Figura 5). Varios autores (Azarbad *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2016) han estudiado la respuesta en la comunidad microbiana y su funcionalidad, 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 los metales, aumenta la aparición de genes resistentes. Azarbad *et al.* (2015), discutiendo, además, la dificultad que existe para plantear un mecanismo por contaminación con metales pesados, que cada sistema depende de diversos factores como son el tipo de suelo y metales contaminantes, el tiempo de exposición al metal y la tasa de adaptación de las comunidades microbianas ante la perturbación. Se observó de igual manera, que el amonio fue la especie que menos difirió entre el control y tratamientos durante los 240 días,

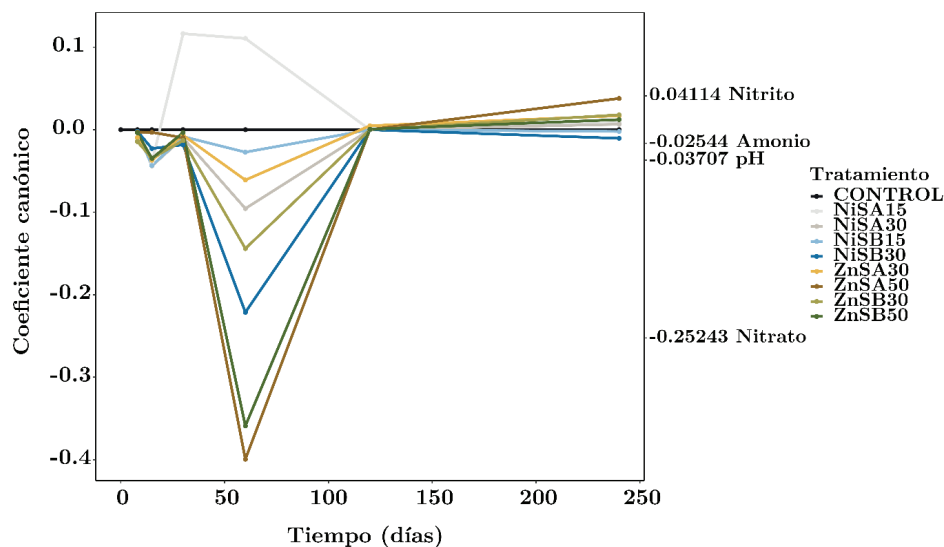
**A**



**B**



**Figura 4.** Movilización de níquel y zinc bajo la perturbación con M-salfen.  
**Figure 4.** Mobilization of nickel and zinc under disturbance with M-Salphen.



**Figura 5.** 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 reserva de nitrógeno inorgánico y pH a lo largo del tiempo. Los coeficientes canónicos indican la distancia entre la concentración de la reserva de nitrógeno inorgánico en las muestras de todos los tratamientos en relación con el control no perturbado.  
**Figure 5.** Effects of M-Salphen on the recovery of nitrogen cycle functionality. A main response curve of the inorganic nitrogen reserve concentrations and pH over time is represented. The canonical coefficients indicate the distance between the concentration of the inorganic nitrogen pool in the samples of all treatments in relation to the undisturbed control.



lo que indicó mayor estabilidad entre el tipo de compuesto utilizado para la perturbación y el tiempo. 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. Tan solo en la última década, varios estudios han revelado que su aplicación desencadena múltiples respuestas fisiológicas y morfológicas, así como, cambios específicos en la expresión génica, el metabolismo, el estado redox o la arquitectura del sistema radicular de las plantas (Isobe y Ohte, 2014; Hirsch y Mauchline, 2015). Además, su propiedad insoluble le confiere la capacidad de no filtrarse hacia aguas subterráneas a través del suelo, aumentándose así la probabilidad de su asimilación por parte de otros organismos, a diferencia del nitrato que es más fácilmente movilizado, pudiendo ocasionar la eutrofización del medio (Hirsch y Mauchline, 2015). Por otro lado, el nitrato fue la especie que indujo mayormente la diferenciación entre tratamientos, sobre todo a los 60 días, en donde se pudo observar una concentración ascendente en NiSB30 < ZnSB30 < NiSA30 < ZnSA30 < NiSB15 < NiSA15 < ZnSA50 < ZnSB50, lo cual sugiere que, independientemente del metal y la estructura de M-salfen utilizado, la concentración de 30 mg kg<sup>-1</sup> de suelo fue la que indujo la mayor concentración de nitrato en el suelo.

Los análisis de componentes principales (PCA), demostraron la correlación de las diferentes variables fisicoquímicas, evaluadas respecto a la reserva de nitrógeno inorgánico como proxy de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno en el suelo evaluado, demostrando que, los cambios ocurridos en el sistema, se correlacionaron con el tiempo del efecto causado por la perturbación aplicada con los compuestos tipo M-salfen (Figura 3). El perfil obtenido a los 240 días, mostró el aparente incremento y recuperación de los indicadores del ciclo del nitrógeno en todos los tratamientos, pudiendo 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.

Finalmente, basados en el análisis de coeficientes canónicos y PCA, desde el punto de vista económico y agronómico, el mejor momento para obtener beneficios respecto a la aceleración de la nitrificación, corresponde a 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. Shimazaki (2013), reportó previamente que, algunos complejos de tipo M-salfen, han sido utilizados también como catalizadores en conversión molecular orgánica, al igual que Escárcega-Bobadilla *et al.* (2013) demostraron la propiedad catalizadora de un compuesto Zn-salfen trinuclear, favoreciendo la fijación de dióxido de carbono en la formación de carbonatos cíclicos orgánicos. Por otro lado, los compuestos M-salfen de zinc, resultaron depresores de la amonificación y nitrificación en el suelo.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede 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.

Así mismo, se ha demostrado que la biorremediación *in situ* con bacterias, se puede llevar a cabo con microorganismos disimilatorios reductores usando compuestos orgánicos como ligandos donadores de electrones, de tal manera que los metales pesados puedan ser complejados y precipitados (Lovley *et al.*, 2004). Para el presente estudio, los resultados sugieren que pudo ocurrir una estimulación de las bacterias reductoras de nitrito, lo cual provocó una 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, reflejándose lo anterior en el incremento de níquel y zinc a los 240 días en todos los tratamientos, a excepción del caso de ZnSA30 y ZnSB30. Esto último 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.

## CONCLUSIONES

Las perturbaciones aplicadas a los microcosmos construidos con suelo agrícola en este estudio, reflejaron cambios significativos en la reserva de nitrógeno inorgánico a partir de los 60 días, así como un cambio en el pH de todos los tratamientos. Lo anterior puede ser ocasionado, probablemente, por la resistencia y adaptación de la comunidad microbiana a los diferentes compuestos M-salfen, contribuyendo a la asimilación de los mismos, 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, esto con base en el incremento observado para ambos metales, llevado a cabo por absorción atómica al final del experimento. Los compuestos M-salfen de níquel y zinc, independientemente de la forma y concentración, podrían ser candidatos para técnicas de biorremediación de sitios contaminados, así como contribuir a disminuir concentraciones tóxicas de amonio cuando éste sobrepase el nitrato, dentro de un periodo de respuesta de 60 días hasta ver su efecto. Así mismo, NiSB15 podría ser utilizado 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. 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 estos resultados, se propone llevar a cabo una profundización en los estudios que pueden, por ejemplo, ser realizados basados en análisis moleculares, para evaluar las variaciones de las comunidades microbianas y su resistencia a los compuestos M-salfen, así como estudios de citotoxicidad que determinen la seguridad en su empleo.

## AGRADECIMIENTOS

A.A López-Pacheco agradece al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) por la beca otorgada (637593). Se agradece al proyecto USO313002927 y a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora. M.V. Escárcega-Bobadilla agradece al CONACyT y a la DGAPA-UNAM por los proyectos 251533 y PAPIIT-IA203918, respectivamente.

## REFERENCIAS

- Aislabie, J. y Deslippe, J.R. 2013. Soil microbes and their contribution to soil services. En: *Ecosystem Services in New Zealand-conditions and trends*. J.R. Dymond (ed), pp 143–161. Mannaaki Whenua Press, Lincoln., New Zealand.
- Ardestani, M.M., van Straalen, N.M. y van Gestel, C.A.M. 2014. Uptake and elimination kinetics of metals in soil invertebrates: a review. *Environ Pollut.* 193: 277–295.
- Azarbad, H., Niklińska, M., Laskowski, R., van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., Zhou, J., He, Z., Wen, C., Röling, W.F.M. 2015. Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *FEMS Microbiology Ecology* 91:1–11.
- Bader, N.R. 2010. Applications of schiff's bases chelates in quantitative analysis: a review. *Rasayan J Chem.* 3: 660–670.
- Cabello, P., Roldán, M.D. y Moreno-Vivián, C. 2004. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology.* 150: 3527–3546.
- Cano-Cruz, M.T. 2018. Estudios de autoensamblaje supramolecular y química anfitrión huésped. MSc dissertation. National Autonomous University of Mexico.
- Calderón, K., Spor, A., Breuil, M.C., Bru, D., Bizouard, F., Violle, C., Bernard, R.L. y Philippot, L. 2017. Effectiveness of ecological rescue for altered soil microbial communities and functions. *ISME J.* 11: 272–283.
- Calderón, K., Philippot, L., Bizouard, F. et al. 2018. Compounded disturbance chronology modulates the resilience of soil microbial communities and N-Cycle related functions. *Front Microbiol.* 6:2721.
- Cota-Ruiz, K., Nuñez-Gastelúm, J.A., Delgado-Rios, M., Martínez-Martínez, A. 2019. Biorremediación: Actualidad de conceptos y aplicaciones. *Biotecnia.* XXI (1): 37–44.
- Daims, H., Lückner, S., Wagner, M. 2016. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends Microbiol.* 24: 699–712.
- Das, S., Dash, H.R. y Chakraborty, J. 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100: 2967–2984.
- Escárcega-Bobadilla, M.V., Martínez Belmonte, M., Martín, E., Escudero-Adán, E.C. y Kleij, A.W. 2013. A recyclable trinuclear bifunctional catalyst derived from a tetraoxo Bis-Zn(salphen) metalloligand. *Chem Eur J.* 19: 2641–2648.
- Galán Huertos, E. y Romero Baena, A. 2008. Contaminación de suelos por metales pesados. *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía.* 10: 48–60.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol Biochem.* 30:1389–1414.
- He, Z.L., Yang, X.E. y Stoffella, P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 19: 125–140.
- Hernández-Ramírez, Y. 2018. Estudio de un sistema bioinspirado de autoensamblaje dinámico con un anfitrión tipo salfen fosforado supramolecular. BSc. dissertation. National Autonomous University of Mexico.
- Hirsch, P.R. y Mauchline, T.H. 2015. The importance of the microbial N-Cycle in soil for crop plant nutrition. *Adv. Appl. Microbiol.* 93: 45–71.
- Horikoshi, M., Tang, Y., Dickey, A., Grenié, M., Thompson, R., Selzer, L., Strbenac, D. y Voronin, K. 2019. R package 'ggfortify' version 0.4.7
- Hu, H.W. y He, J.Z. 2017. Comammox-a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *J Soils Sediments.* 17:2709–2717.
- ISO 10390:2005 Soil quality -Determination of pH. 2005. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/40879.html>
- ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods. 1987. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/9169.html>
- ISO 11277:2009 Soil quality-Determination of particle size distribution in mineral soil material — Method by sieving and sedimentation. 2009. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/54151.html>
- Isobe, K. y Ohte, N. 2014. Ecological perspectives on microbes involved in N-cycling. *Microbes Environ.* 29: 4–16.
- Khan, M., Mahmood, A. y Alkhatlan, H.Z. 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.
- Keeney, D.R. y Nelson, D.W. 1982. Nitrogen - inorganic forms. En: *Methods of Soil Analysis.* A. L. Page, R.H. Miller y D.R. Keeney (ed.), pp 643–698. ASA-SSSA, Agron. Madison USA.
- Kosolapov, A.B., Tsybul'ko, E.I., Makarova, E.V. y Cherevach, E.I. 2004. Use of the syrup prepared on the basis of wild-growing grasses of the Far East, in preventive maintenance of respiratory diseases and microelements at children. *Vopr Pitan.* 73: 21–24.
- Liu, Y. y von Wirén, N. 2017. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany.* 68: 2581–2592.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E. y Nevin, K.P. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Physiol.* 49:219–86.
- Mendiburu, F. y Simon, R. 2009. R package 'agricolae' version 1.3-1 agricolae.
- McLean, J.E. y Bledsoe, B.E. 1992. Behavior of Metals in Soils (EPA/540/S-92/018). U.S. Environmental Protection Agency, USA
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J. y Wells, D.M. 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany.* 58: 2297–2306.
- Nelson, M.B., Martiny, A.C. y Martiny, J.B.H. 2016. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. *PNAS.* 113: 8033–8040.
- Ochoa Espinosa, M.F., Armenta Calderón, A.D., Moreno Salazar, S.F., Fernández Herrera, E., Ochoa Meza, A. 2019. Fertilización orgánica y su impacto en la calidad del suelo. *Biotecnia.* XXI (1): 87–92.
- Ojuederie, O.B. y Babalola, O.O. 2017. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *Int J Environ Res Public Health.* 4: 14.

- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R. et al. 2013. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-3.2012
- Olaniran, A.O., Balgobind, A. y Pillay, B. 2013. Bioavailability of heavy metals in soil: Impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *Int J Mol Sci*. 14: 10197–10228.
- Oves, M., Saghir, K.M., Huda, Q.A., Nadeen, F.M. y Almeebi, T. 2016. Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies. *J Bioremed Biodeg*. 7: 334.
- Pérez-Rodríguez, P., de Blas, E., Soto, B., Pontevedra-Pomba, X. y López-Periago, J.E. 2011. The soil use conflict and quality. *CyTA - Journal of Food*. 9: 342–343.
- Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C.M. et al. 2013. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J*. 7: 1609–19.
- SEMARNAT. 2013. 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. pp. 119–154.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M. et al. 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol*. 3:417.
- Shimazaki, Y. 2013. Oxidation chemistry of metal (II) salen-type complexes. En: *Electrochemistry*. M. A. Khalid (ed.), pp 51–70. Intech Open, London.
- Spain, A. 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev. Undergrad Res*. 2:1–6.
- Stein, L.Y. y Klotz, M.G. 2016. The Nitrogen Cycle. *Curr. Biol*. 26: R94-8 d
- van der Putten, W.H. y Wall, D.H. 2018. Ecosystem services provided by soil life. En: *Routledge Handbook of Ecosystem Services*. D. H Wall, R. D. Bardgett, V. Behan-Pelletier, J. E. Herrick, H. Jones, K. Ritz, J. Six, D. R. Strong y W.H. van der Putten (ed.), pp 415–420. Taylor & Francis Group, New York.
- Van Kessel, M.A., Speth, D.R., Albertsen, M., et al. 2015. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*. 528: 555–9.
- Weisany, W., Raei, Y. y Allahverdipoor, K.H. 2013. Role of some of mineral nutrients in biological nitrogen fixation. *Bull Env Pharmacol Life Sci*. 2: 77–84.
- Walkley, A. y Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Sci*. 63:251–263.
- Wickham, H. 2016. *ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis*. R. Springer. Texas
- Zaidi, A., Oves, M., Ahmad, E. y Khan, M.S. 2011. Importance of free-living Fungi in heavy metal remediation. En: *Biomangement of Metal-Contaminated Soils*. Khan et al (eds.), pp 479–494. Springer. Netherlands.