UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFECTO DEL RIEGO CON AGUA RESIDUAL SOBRE LA ABUNDANCIA Y DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES OXIDADORAS DE AMONIO DE LOS SUELOS AGRÍCOLAS DEL VALLE DEL MEZQUITAL, HIDALGO, MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

EDUARDO JAVIER AGUILAR RANGEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. ROCÍO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA LUCIA PRADO PANO
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
DRA. MARÍA SOLEDAD VÁSQUEZ MURRIETA
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2024

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y

HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Efecto del riego con agua residual sobre la abundancia y diversidad de las comunidades oxidadoras de amonio de los suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hidalgo, México.

Que presenté para obtener el grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS, es original, de mí autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

Atentamente

AGUILAR RANGEL EDUARDO JAVIER
No. de cuenta UNAM: 308038761
(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFECTO DEL RIEGO CON AGUA RESIDUAL SOBRE LA ABUNDANCIA Y DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES OXIDADORAS DE AMONIO DE LOS SUELOS AGRÍCOLAS DEL VALLE DEL MEZQUITAL, HIDALGO, MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

EDUARDO JAVIER AGUILAR RANGEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. ROCÍO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: **DRA. BLANCA LUCIA PRADO PANO**
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
DRA. MARÍA SOLEDAD VÁSQUEZ MURRIETA
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD INSTITUTO DE GEOLOGIA
OFICIO: CGEP/CPCB/IGEL/0466/2024
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria (Virtual) del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de mayo de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **AGUILAR RANGEL EDUARDO JAVIER** con número de cuenta **308038761** con la tesis titulada **"Efecto del riego con agua residual sobre la abundancia y diversidad de las comunidades oxidadoras de amonio de los suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hidalgo, México",** realizada bajo la dirección de la **DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ,** quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente:	DRA. CHRISTINA DÉSIRÉE SIEBE GRABACH
Vocal:	DR. IVÁN MORENO ANDRADE
Vocal:	DR. LUIS EDUARDO SERVÍN GARCIDUEÑAS
Vocal:	DRA. FRÉDÉRIQUE LUCIENNE DENISE REVERCHON
Secretario:	DRA. BLANCA LUCIA PRADO PANO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 11 de junio de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/MRJ/EARR/mrj

Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por ser pieza clave en mi formación académica. Cuya guía me dirigió a despertar una curiosidad inefable sobre los procesos biológicos que gobiernan este planeta. Fomentando en mi la capacidad de dominar metodologías que me permitieron generar conocimiento para responder a algunas preguntas derivadas de dicha curiosidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada durante el doctorado, a mi nombre Eduardo Javier Aguilar Rangel (CVU 775174). Al PAEP, por el apoyo para presentar un trabajo científico derivado de esta tesis en el 18th International Symposium on Microbial Ecology. El presente proyecto de tesis fue posible gracias al apoyo de los fondos UNAM-PAPIIT IG101221 e IG101524, enfocados en proyectos de categoría grupal en torno al uso de agua residual para riego en zonas agrícolas.

Agradezco a la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández por su apoyo durante al doctorado, así como las Dra. María Soledad Vásquez Murrieta y la Dra. Blanca Lucía Prado Pano por su acertada asesoría como parte de mi Comité Tutor.

Agradecimientos a título personal

A la Dra. Rocio Alcántara, por haber sido mi tutora por más de seis años y ser participé primordial en mi formación. Sobre todo, por siempre haberme impulsado a aprender nuevas cosas y haber puesto todo de ella para cumplir mis metas académicas y personales.

A la Dra. Christina Siebe, la Dra. Blanca Prado, el Dr. Iván Moreno, la Dra. Frédérique Reverchon y al Dr. Luis Servín por tomarse el tiempo y sus recomendaciones que me permitieron mejorar significativamente el presente trabajo.

A Jorge René Alcalá Martínez, Javier Tadeo León, Lucy Mora Palomino, Maricarmen Salazar Ledesma e Iris Suárez Quijada, por su apoyo técnico en la realización de este proyecto. A los Drs. Daniel Medina, Luis Servín y el M. en C. Roberto Marín, por el apoyo científico y técnico en los análisis metagenómicos. Este trabajo se realizó en coordinación con los siguientes laboratorios: Laboratorio de Genómica y Biotecnología del Instituto de Geología, UNAM, Laboratorio del Cromatografía del Laboratorio Nacional del Geoquímica y Mineralogía (LANGEM), Sección de ICP del Laboratorio Nacional del Geoquímica y Mineralogía (LANGEM), y Laboratorio de Física de Suelos (LANGEM).

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haber sido mi casa durante toda mi formación académica.

Al Instituto de Geología y su personal, por el espacio y las facilidades para desarrollarme personalmente en los últimos años.

A mis compañeros de trabajo en el IG, ya que hicieron del laboratorio donde era divertido aprender cosas nuevas.

A mis compañeros de Laboratorio en la Universidad San Sebastián de Puerto Montt (Dani, Cathy y Dellis), porque me hicieron sentir en casa aun cuando me encontraba lejos de ella.

A todos colegas y amigos que me ha dejado el posgrado, por sus palabras, consejos y sobre todo las incontables risas.

A mis amigos de la Catedral Porta Coeli, por su apoyo en mis tiempos oscuros y sobre todo por su guía.

A mi familia, por siempre estar ahí y confiar en mí siempre

A mis amigos, por siempre sacarme una sonrisa y darme una palmada en la espalda cuando lo necesité.

A todos aquellos que han formado parte de mi vida

A mis padres y mi tío, por ser la base que me formó y me sostiene diario

Índice

1 Resumen 1
2 Abstract 3
3 Introducción 5
3.1 El suelo y sus microorganismos 6
3.1.1 Las comunidades microbianas del suelo 7
3.1.2 Los suelos agrícolas y su microbiología 8
3.2 Los microorganismos del ciclo del N en el suelo, y la nitrificación 9
3.2.1 El ciclo del N en suelos agrícolas 9
3.2.2 Nitrificación 10
3.2.3 La oxidación de amonio 10
3.2.4 Factores que influyen en la oxidación de amonio en suelo 13
3.3 Efecto del riego con agua residual en el suelo 15
3.3.1 Reúso de agua residual con fines agrícolas 15
3.3.2 Efecto del agua residual sobre la comunidad microbiana del suelo 16
3.3.3 Ciclaje de nitrógeno en suelos regados con agua residual 17
3.4 El uso de herramientas moleculares para el monitoreo del suelo. 19
3.5 Valle del Mezquital y su relación con el agua residual 22
4 Justificación 24
5 Hipótesis 25
6 Objetivos 26
6.1 General 26
6.2 Específicos 26
7 Antecedentes 27
8 Materiales y métodos 29
8.1.1 Sitio de estudio 30
8.1.2 Muestreo de suelos en una cronosecuencia de antigüedad de riego 30
8.1.3 Experimento de riegos continuos de columnas inalteradas de suelo 31
8.1.4 Caracterización fisicoquímica del suelo 33
8.1.5 Extracción de DNA y amplificación de genes de interés 33
8.1.6 Análisis de las secuencias 35
8.1.7 Cuantificación de los genes *amoA y 16S rRNA* 36
8.2 Procesamiento, secuenciación y análisis de los metagenomas 37
8.2.1 Análisis de secuencias obtenidas de los metagenomas 37
8.3 Análisis estadísticos 39

9 Resultados 40
9.1 Cambios en la estructura de la comunidad oxidadora de amonio debido a la irrigación con agua residual por largos periodos de tiempo. 40
9.1.1 Alteraciones en el ambiente fisicoquímico del suelo 40
9.1.2 Cambios en la abundancia de los oxidadores de amonio en una cronosecuencia..... 41
9.1.3 Cambios en la diversidad y estructura de la comunidad oxidadora de amonio 43
9.1.4 Aproximación taxonómica de los genes *amoA* 46
9.1.5 Abundancias relativas de los grupos taxonómicos identificados 48
9.1.6 Correlación del componente microbiológico con las características fisicoquímicas del suelo 52
9.2 Diversidad génica de los genes involucrados en la oxidación de amonio en una cronosecuencia de suelos regados con agua residual usando herramientas metagenómicas 53
9.2.1 Detección de probables oxidadores de amonio 53
9.2.2 Identificación de especies oxidadoras de amonio a través del gen *amoA* 55
9.2.3 Abundancia de genes *amoA* relacionados a AOA, AOB y Comammox . 58
9.2.4 Comparación entre los filotipos obtenidos por secuenciación de amplicones y metagenómica..... 60
9.3 Efecto del cambio de la calidad de agua de riego en oxidadores de amonio en suelos regados con agua residual. 62
9.3.1 Variaciones en la abundancia relativa de organismos oxidadores de amonio en los suelos 63
9.3.2 Efecto del agua de la planta de tratamiento sobre la estructura de la comunidad oxidadora de amonio 66
9.3.3 Impacto del cambio de calidad de agua en la abundancia de los oxidadores de amonio..... 68
9.3.4 Correlación de los grupos oxidadores de amonio con el ambiente fisicoquímico del suelo 72
10 Discusión..... 74
10.1 La comunidad oxidadora de amonio cambia con el tiempo bajo riego con agua residual. 74
10.2 El uso de herramientas metagenómicas brinda una mayor profundidad en la identificación de microorganismos oxidadores de amonio. 79
10.3 Efecto del cambio en la calidad del agua de riego sobre las comunidades oxidadoras de amonio 81
11 Modelo conceptual 86
12 Conclusiones..... 88
13 Perspectivas..... 89

14 Referencias 90
15 Anexos 112
16 Artículo publicado 114

Lista de abreviaciones

AO: Oxidadores de amonio
AMO: Monooxigenasa de amonio
AOA: Arqueas Oxidadoras de Amonio
AOB: Bacterias Oxidadoras de Amonio
ASV: Variante en la secuenciación amplicones
B: Bojayito
CE: Conductividad eléctrica
Comammox: Oxidación completa de amonio (*Complete ammonia oxidation*)
Corg: Carbono orgánico
Ct: Carbono total
HAO: Hidroxilamina oxidoreductasa
IT: índice de toxicidad
LP: Las Palmas
MAG: Genoma ensamblado de un metagenoma
NGS: Secuenciación de nueva generación
Nt: Nitrógeno total
ORF: Marco abierto de lectura
OTU: Unidad operativa taxonómica
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PTAR-A: Planta de Tratamiento de Agua Residual Atotonilco
PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
R# (i. e. R0): Número de riego
ST: Suelo de temporal
TW: Agua de la PTAR
UT: Ulapa-Tetepango
WW: Agua residual

1 Resumen

La irrigación con agua residual es una práctica común en sistemas agrícolas en zonas áridas y semiáridas. Dicha práctica representa una entrada constante de carbono (C) y nitrógeno (N) en el sistema, así como de contaminantes como metales que se acumulan en el suelo con el paso del tiempo. El riego con agua residual sin tratar implica además un riesgo sanitario, por lo que la Organización Mundial de la Salud recomienda tratar al agua para reducir potenciales patógenos. El amonio es una de las formas principales de nitrógeno en el agua residual, por lo que el riego constante con ésta aumenta la abundancia de las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) y las arqueas oxidadoras de amonio (AOA) en el suelo. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto de estos riegos sobre la composición de estas comunidades. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto que tiene el riego con agua residual sobre la abundancia y diversidad de las comunidades oxidadoras de amonio en suelos agrícolas regados con agua residual a largo plazo, y sus posibles modificaciones ante el cambio en la calidad del agua por el tratamiento de la misma. En México, el Valle del Mezquital en Hidalgo es una zona agrícola con una práctica de riego con agua residual por más de 100 años, siendo un modelo ideal para este trabajo, debido a que además se está llevando a cabo un cambio en la calidad del agua de riego derivado del tratamiento por la Planta de Tratamiento de Agua Residual Atotonilco (PTAR-A).

Se muestrearon suelos irrigados con agua residual por diferentes periodos de tiempo (25, 50 y 100 años) y uno de temporal (nunca regado con agua residual), y se estudiaron sus comunidades AOA y AOB a través de secuenciación de amplicones (16S rRNA y *amoA*), y enfoques metagenómicos. También, se analizaron los efectos del cambio en la calidad del agua de irrigación de agua residual a tratada en suelos regados por 100 años sobre las AOA y AOB. Finalmente se llevó a cabo la correlación de las variaciones en las propiedades fisicoquímicas de los suelos producto del tipo de agua usada en sus riegos, junto a los cambios en la microbiota de éstos.

Los suelos regados con agua residual mostraron una mayor abundancia de AOA y AOB comparados con el suelo de temporal. Se observó que tras 100 años de riego la relación entre el gen *amoA* de AOA:AOB fue cercana a 1.5, mientras que, en los suelos de temporal ésta fue cercana a 9, sugiriendo que con el tiempo se enriquecen las comunidades AOB en mayor medida que las AOA. Además, la estructura de la comunidad de AOA y AOB cambió posterior al riego con agua residual, donde ciertos filotipos afiliados a *Nitrososphaera* y *Nitrosocosmicus* se incrementaron significativamente. Posteriormente, fue confirmada la correlación positiva significativa entre el pH del suelo y la estructura de la comunidad oxidadora de amonio, principalmente para las AOB. El índice de toxicidad calculado a partir de la concentración de metales pesados en el suelo mostró una correlación positiva con la abundancia de las AOB; mientras que, el contenido de C estuvo más asociado positivamente con la abundancia de AOA. Para comprobar que se estaba captando el total de la comunidad AOA y AOB por la secuenciación masiva del gen *amoA*, se analizaron cuatro metagenomas de suelo, uno para cada sitio con diferente tiempo de riego. Los análisis confirmaron que *Nitrososphaera* y *Nitrosocosmicus* (AOA), y *Nitrospira* y *Nitrosomonas* (AOB) fueron los filotipos más abundantes en los suelos de la cronosecuencia. Sin embargo, fueron detectados otros grupos como *Nitrosovibrio* y *Nitrosopolaris*, o inclusive cepas ambientales no afiliadas aún, así como grupos *Nitrospira* afiliados a procesos de la oxidación completa de amonio (commamox). Así, los grupos previamente detectados con la secuenciación de amplicones fueron confirmados mediante los genes *amoA* obtenidos de este análisis, así como un nuevo grupo de AOB aún no definido, y bacterias commamox. Finalmente, en un experimento de columnas inalteradas con suelos regados por ~100 años, se vio que el uso del agua de la PTAR-A puede llevar a cambios en la estructura de la comunidad de las AOB y su abundancia, posiblemente por

la disminución en la entrada de amonio y contaminantes. No hubo una respuesta significativa en la comunidad de las AOA, particularmente en los suelos ligeramente ácidos, probablemente por su resiliencia o porque la tasa de cambio es de una temporalidad mayor a la estudiada en el presente estudio. En conclusión, este estudio muestra que el uso de agua residual y los cambios en su composición por su tratamiento si afectan a las comunidades oxidadoras de amonio, siendo diferenciales sus efectos en las AOA y las AOB, probablemente por sus diferencias fisiológicas.

2 Abstract

Wastewater irrigation is a common practice in agricultural systems in arid and semiarid zones. This practice represents a constant input of carbon (C) and nitrogen (N), as well as contaminants such as metals which accumulate in soil through time. Irrigation with untreated water represents a sanitary hazard, so the World Health Organization recommends irrigating with treated water to reduce health risks. Ammonia is one of the main N-forms in wastewater, hence, the constant irrigation with this kind of water increases the abundance of ammonia oxidizing bacteria (AOA) and ammonia oxidizing archaea (AOA). Nevertheless, the information about the effect of the irrigation with wastewater on these communities is still scarce. The objective of this study was to determine the effect of wastewater irrigation over the abundance and diversity of the ammonia oxidizer communities in long-term wastewater irrigated agricultural soils, and their possible modifications by a change in the quality of irrigation water. In Mexico, the Mezquital Valley, Hidalgo, is an agricultural zone irrigated with wastewater for more than 100 years, being an ideal model for this investigation because in the last few years, the establishment of the Atotonilco Wastewater Treatment Plant (PTAR-A) is inducing an irrigation water quality change.

Wastewater irrigated soils for different lengths of time (25, 50 and 100 years), and a rainfed soil (never irrigated with wastewater) were sampled, and their AOA and AOB communities were studied using amplicon sequencing (16S rRNA and *amoA* genes) and metagenomic approaches. Furthermore, the response of AOA and AOB to changes in water irrigation quality from wastewater to reclaimed water over 100 years irrigated soils were analyzed. Then, physicochemical soils properties were correlated with the microbial variables to detect determinants of the observed changes in the microbiota of the studied soils.

Wastewater irrigated soils showed a higher abundance of AOA and AOB in comparison with rainfed soils. It was observed that *amoA* AOA:AOB ratio in 100 years irrigated soils was close to 1.5, while in rainfed soils the ratio was close to 9, suggesting an AOB enrichment with irrigation time. Besides, the AOA and AOB community structure changed after wastewater use for irrigation, where phylotypes affiliated to *Nitrososphaera* and *Nitrosocosmicus* increased significantly. Then, the positive significant correlation between soil pH and the ammonia oxidizing community was confirmed, mainly for AOB. A toxicity index calculated on behalf of the concentration of heavy metals in soils, showed a positive correlation with the AOB abundance, while C content was positively associated with the AOA abundance. A metagenomic approach was further used to verify the completeness of AOA and AOB communities as assessed by amplicon sequencing of the *amoA* gene, by considering the four metagenomes (one for each irrigation time). This analysis confirmed that *Nitrososphaera* and *Nitrosocosmicus* (AOA), and *Nitrospira* and *Nitrosomonas* (AOB) were the most abundant phylotypes of the soil chronosequence. However, other groups such as *Nitrosovibrio* and *Nitrosopolaris,* or unidentified environmental strains, were detected, as well as other *Nitrospira* groups affiliated to the complete ammonia oxidation (comammox) process. In this way, the groups previously detected with amplicon sequencing were confirmed with *amoA* genes obtained from this approach, as well as a new not defined AOB group, and comammox bacteria.

Finally, using an unaltered soil column experiment with ~100 years irrigated soils, we observed that water from PTAR-A could lead to changes in structure of the AOB community and their abundance, probably by diminishing the ammonia and contaminants input. There was no significant change in the AOA community, particularly in the slightly acid soil, possibly due to its resilience, or because the change rate needs a longer temporality than offered in the current study. In conclusion, the current study showed that the continuous use of wastewater and the changes in its composition after treatment do affect the ammonia

oxidizing communities, in different magnitude in AOA and AOB, probably due to their physiological differences.

3 Introducción

La escasez de agua es un problema de índole mundial que se ha magnificado durante las últimas décadas debido al incremento poblacional, el crecimiento económico, la demanda en los sectores productivos, las técnicas de irrigación ineficientes y la deficiente infraestructura para el almacenamiento y tratamiento de agua, entre otros (Chitsaz y Azarnivand, 2017). Este problema se acentúa sobre todo en zonas áridas o semiáridas, donde la constante escasez de lluvia, acompañada de altas tasas de evaporación y evapotranspiración –producto de la radiación solar–, se reflejan en un estrés hídrico superior al observado en otras partes del planeta (Rodriguez et al., 2016). Estas áreas representan alrededor del 40% de la superficie terrestre (**Fig. 1**), y albergan más de la tercera parte de la población mundial (Mortimore et al., 2009). Los reportes estiman que estas regiones se encuentran cerca del límite anual de requerimientos hídricos por persona, el cual está establecido en 1000 m^3 per cápita, sin embargo, en algunas zonas podría ser de solo 500 m^3 per cápita (Wallace, 2000), que representa un déficit hídrico del 50%. Aunado a ello, se ha predicho que en los próximos años estas regiones no tendrán las reservas hídricas suficientes para mantener la producción de alimentos procedentes de la agricultura (Seckler et al., 1999).

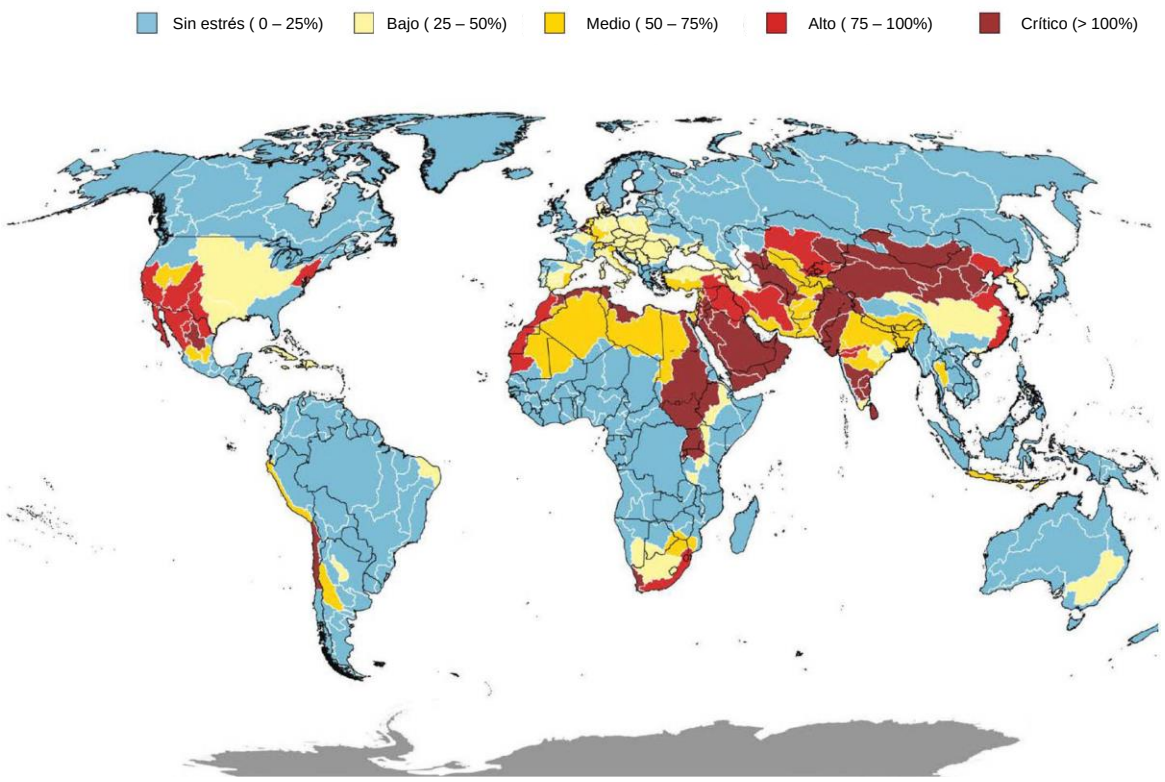

Figura 1 Regiones a nivel global con algún nivel de estrés hídrico. (Modificado de FAO (2021)).

Esta problemática de la escasez del agua compromete la producción agrícola en la actualidad y a futuro. Actualmente, la agricultura ocupa cerca del 12% de la superficie terrestre y consume aproximadamente el 70% del agua dulce, sin embargo, existen estimaciones de que este consumo podría elevarse hasta el 90% en un futuro cercano (Mancosu et al., 2015). En los últimos años se han sugerido alternativas desde el ámbito

político, social e ingenieril para mitigar la falta de agua para el riego en estas zonas (Ingrao et al., 2023).

Dentro de las propuestas para resolver la falta de agua, destaca la de reusar el agua residual para la irrigación de los campos de cultivo. Esta estrategia se usa desde hace siglos, y es una de las más empleadas hoy en día, especialmente en poblaciones en regiones áridas y semiáridas con un constante crecimiento poblacional y una acelerada industrialización, como en la India, China y México (Singh, 2021). Ante el constante incremento de esta práctica, los estudios sobre sus ventajas y desventajas comienzan a incrementarse. Actualmente, se sabe que existen beneficios varios, como el uso de una fuente de agua barata, con nutrientes y que fomenta el crecimiento de los cultivos (Zhang y Shen, 2019). Sin embargo, se ha observado que el constante uso de agua residual puede ocasionar la acumulación de contaminantes como antibióticos o metales, así como cambios en la microbiota de los suelos irrigados principalmente por las variaciones en su ambiente fisicoquímico (Broszat et al., 2014; Carrillo et al., 2016; Siebe, 1995). Dentro de este esquema, poco se ha investigado a las poblaciones específicas encargadas de procesos del ciclo del nitrógeno (N), y donde sus abundancias se ven aumentadas, como en las comunidades oxidadoras de amonio que son favorecidas por el constante ingreso de amonio y formas orgánica de N en el agua residual (Hernández-Martínez et al., 2018; Lüneberg et al., 2018).

En México, la zona agrícola del Valle del Mezquital en Hidalgo representa una región en la que la práctica del riego de cultivos agrícolas con agua residual se remonta a principios del siglo XX. Hoy en día es una de las zonas más extensas y de mayor antigüedad en el mundo (Jiménez y Chávez, 2002). La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto que ha tenido el riego con agua residual sobre la abundancia y diversidad de las comunidades oxidadoras de amonio de los suelos agrícolas del Valle del Mezquital a largo plazo, y sus posibles modificaciones ante el cambio de la calidad del agua usada para el riego. Para ello, se emplearon estrategias independientes del cultivo para explorar a las comunidades oxidadoras de amonio, cuantificando y secuenciando genes clave por técnicas de 2ª generación y haciendo un tamizaje metagenómico. Todas estas herramientas se emplearon en muestras de suelos agrícolas colectadas de una cronosecuencia de suelos agrícolas, es decir provenientes de parcelas que han sido irrigadas por 25, 50 y 100 años con agua residual. Adicionalmente se implementó un experimento bajo condiciones controladas en invernadero, donde columnas de suelo de 30 cm de largo y 15 cm de diámetro, extraídas de una parcela regada por 100 años con agua residual sin tratar, fueron regadas con agua residual de diferente calidad durante 180 días. Al término de este tiempo se analizaron las comunidades oxidadoras de amonio y las características fisicoquímicas de los suelos.

3.1 El suelo y sus microorganismos

El suelo es un compartimento de la geosfera que comprende la parte más externa de la corteza terrestre. Este es un cuerpo natural es dinámico, complejo y activo, ya que se encuentra en constante formación y evolución; así, las propiedades del suelo en un sitio específico de la corteza terrestre es la respuesta a diferentes factores formadores como el clima, la biota, la topografía, y el material parental, entre otros (Minami, 2021). De manera general, los suelos se componen de una parte mineral, que incluye minerales primarios y secundarios procedentes de los sedimentos o rocas sobre los que el suelo se está formando y de los procesos de intemperismo ocurrido *in situ*, así como por una fracción orgánica que corresponde al edafón (biota viva asociada) y las raíces vivas, así como a la materia

orgánica muerta en proceso de descomposición y a los compuestos húmicos resultantes del mismo (Costantini y Mocali, 2022). La evolución de las propiedades abióticas del suelo tiende a ser más lenta en relación con los tiempos en los que ocurren los cambios biológicos y ecológicos en el edafón. Mientras los cambios en la fracción orgánica del suelo pueden suceder en décadas a siglos, los relacionados con la fracción mineral pueden prologarse hasta milenios. En el caso específico de los cambios en el componente microbiano del suelo los tiempos pueden llegar a ser más cortos.

El suelo es un compartimento clave en la zona critica, la zona externa del planeta primordial para el establecimiento de la vida en la Tierra (White et al., 2015). La zona crítica está delimitada por el límite superior de la cubierta vegetal hasta los compartimentos subterráneos donde fluye el agua subterránea. En particular, el suelo representa una zona de interacción entre la atmósfera, hidrosfera, biosfera y la litosfera. Por lo que es central en el establecimiento de diversos procesos biogeoquímicos y físicos que se llevan a cabo en la zona critica, y por lo tanto necesario para la vida (Banwart et al., 2019).

Los suelos suelen diferenciarse en horizontes a medida que avanza la pedogénesis, la cual puede interrumpirse por procesos geomorfológicos que transportan sedimentos de un sitio a otro (Hartemink et al., 2020). Los horizontes O y A suelen ser las capas superiores donde ocurre la descomposición de la materia orgánica muerta. Por lo mismo, éstos muestran mayor actividad biológica y mayores contenidos de los nutrientes N y P. Además, al ser los horizontes más superficiales, la influencia de procesos de secado y humedecimiento, así como del oxígeno atmosférico suele ser mayor, por lo que son más propensos a cambios abruptos en tiempos cortos, lo que dificulta su estudio. La biota del suelo, i.e. el edafón, reacciona a estos cambios abruptos y su comportamiento es altamente variable en el tiempo. Por el otro lado, la fracción sólida y sobre todo la mineral, tiene tasas de cambio mucho más lentas, lo que facilita su estudio. La fracción sólida del suelo está formada por minerales primarios y secundarios heredados del material parental, o bien producto del avance de la pedogénesis, así como por una fracción orgánica muerta que se encuentra en proceso de transformación y acumulación en forma de compuestos húmicos. (Costantini y Mocali, 2022).

La agricultura transforma a las propiedades de los suelos bajo coberturas naturales, y ocasiona cambios en los almacenes de nutrientes como el C y el N, lo que altera el ciclaje de estos elementos. Aunado a ello, del manejo antrópico puede generar cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo como en el pH o en la conductividad eléctrica (Falkengren-Grerup et al., 2006; Quinton et al., 2010). Se ha comprobado que las prácticas agrícolas como la labranza convencional, el uso de agroquímicos (como pesticidas o ciertos fertilizantes) y el mismo riego tienen un efecto sobre la estructura de la comunidad microbiana de los suelos agrícolas (Gupta et al., 2022). Finalmente, también se ha observado el efecto del cultivo sobre las propiedades del suelo y sobre sus comunidades microbiológicas

3.1.1 Las comunidades microbianas del suelo

El suelo es un sistema complejo que se encuentra en constante interacción con su entorno biológico, principalmente con su componente microbiológico (hongos, bacterias, arqueas, protozoarios, entre otros) (Schulz et al., 2013). La relación entre los sistemas edáficos y las comunidades microbianas es compleja y dinámica, ya que este sistema es considerado como uno de los principales reservorios de diversidad microbiana en el planeta (Curtis et al., 2002). Dicha diversidad microbiana le confiere al suelo la capacidad funcional para otorgar ciertos servicios ecosistémicos como la producción de alimentos y fibras, la

purificación de agua o la eliminación de contaminantes (Crawford et al., 2005). Las comunidades microbianas, compuestas por bacterias, arqueas y hongos, albergan una gran diversidad metabólica, y realizan variadas funciones de ciclaje y transformación de nutrientes y contaminantes (Lüneberg et al., 2018, 2019). Sin embargo, la composición de la comunidad microbiana y, por lo tanto, su capacidad funcional es altamente variable entre los diferentes tipos de suelos, ya que estas responden a sus propiedades fisicoquímicas, sus relaciones ecológicas y las condiciones ambientales (Castro et al., 2010; Custodio et al., 2022).

Las condiciones fisicoquímicas del suelo que más influyen en el establecimiento de la biota son el pH, la humedad, la disponibilidad de oxígeno, la presencia de macronutrientes, la salinidad y la presencia de elementos traza (micronutrientes y contaminantes). Estas condiciones suelen ser dinámicas y están asociadas con el clima, la estructura del suelo, la cobertura vegetal o la injerencia humana (Abbas et al., 2019; Zhou et al., 2017). Además, existen procesos biológicos que influyen en el establecimiento y funcionamiento de la comunidad microbiana. En este caso se destacan las interacciones ecológicas que impactan directamente sobre los distintos niveles tróficos en función de la variabilidad genética (riqueza, equitatividad) presente en el sitio (Torsvik y Øvreås, 2002).

La interacción entre el medio biótico y abiótico genera condiciones específicas variables en los suelos, y dicha heterogeneidad conlleva a una gran diversidad microbiana. Sin embargo, gran parte de esta diversidad es aún enigmática debido al poco alcance de las técnicas que se han usado para la identificación de los organismos en la mayor parte de la historia del estudio de la microbiología de los suelos. Se estima que en promedio podría haber 26 x 10^{28} células microbianas en los suelos del planeta (Rosselló-Mora y Amann, 2001). Sin embargo, gran parte del componente microbiano es desconocido, aunque cada vez se conoce más por estudios dependientes e independientes de cultivo. Por ejemplo, los estudios fisiológicos han podido definir ciertas funciones principales llevadas a cabo por bacterias y arqueas, y con ello resalta su importancia en este sistema (Tiedje et al., 1999).

Entre las funciones principales que llevan a cabo los microorganismos en el sistema suelo están (Nannipieri et al., 2003):

- La promoción del crecimiento vegetal,
- el ciclaje biogeoquímico,
- la degradación de la materia orgánica,
- la eliminación de contaminantes

3.1.2 Los suelos agrícolas y su microbiología

Los suelos agrícolas fértiles tienen una gran diversidad microbiana, que les permiten mantenerse productivos en el largo plazo, y con ello soportar los constantes ciclos de producción vegetal (Pankhurst et al., 1996); por lo que es crucial mantener la fertilidad de los suelos y un balance en el ciclaje de nutrientes. En los sistemas agrícolas se destacan las relaciones entre las plantas y la microbiota por lo que es común subdividir la diversidad microbiana en aquella del suelo *sensu stricto* y aquella asociada a las raíces de las plantas (rizosfera), siendo esta última la más diversa y con mayor abundancia microbiana (Xu et al., 2021). Aunque esta afirmación puede variar según el tipo de suelo y agroecosistema (García‐Salamanca et al., 2013).

En el suelo de sistemas agrícolas, gran parte de la diversidad microbiana es propia de los ambientes edáficos en general y se ve contenida en un núcleo definido por bacterias pertenecientes a Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria y Choloroflexi. Aunque, otros

grupos como Firmicutes, Nitrospirae y Gemmatimonadetes de igual forma son abundantes en suelos agrícolas (Jiao et al., 2019). Por otro lado, las arqueas no fueron tomadas en cuenta por mucho tiempo, sin embargo, recientemente se ha observado que son importantes en estos sistemas por su participación significativa en el ciclaje de nutrientes (*v.g.*, Nitrososphaerales son arqueas oxidadoras de amonio), producción de hormonas de crecimiento vegetales (*v.g.*, *Sulfolobus acidocaldarius* puede producir ácido indol-3-acético), o la producción de sideróforos para facilitar el acceso a hierro (por arqueas halófilas como *Halococcus saccharolyticus)* (Naitam y Kaushik, 2021).

3.2 Los microorganismos del ciclo del N en el suelo, y la nitrificación

La evolución de la Tierra ha estado acompañada de equilibrios dinámicos entre las especies químicas oxidadas y reducidas que previo a la vida, correspondían directamente a las condiciones ambientales. Sin embargo, con el surgimiento de la vida y su diversificación metabólica, los microorganismos se han convertido en ingenieros biogeoquímicos del ambiente a lo largo del tiempo (Falkowski et al., 2008; Madsen, 2011).

El suelo, es uno de los mayores reservorios de diversidad y abundancia microbiológica del planeta. Esta reserva microbiológica posee un gran potencial metabólico que fomenta la interacción abiótica y biótica de las diferentes esferas de la zona crítica, lo que lo coloca como un sistema clave en el ciclaje biogeoquímico global. Consecuentemente, el ciclaje de elementos como el carbono, fósforo o nitrógeno tiene como actor principal el sistema suelo (Smith et al., 2015). Sin embargo, la injerencia antrópica en estos procesos ha provocado un aceleramiento de la mayoría de éstos o, al contrario, una inhibición de algunos. En ambos casos, estos cambios en las tasas de ciclaje podrían provocar cambios significantes a largo plazo y, por lo tanto, desequilibrios biogeoquímicos con impacto global (Hesterberg, 1998; Rousk y Bengtson, 2014).

3.2.1 El ciclo del N en suelos agrícolas

Dentro de los ciclos biogeoquímicos del suelo destaca el del nitrógeno, debido a su relevancia en sistemas agrícolas, ya que estos se encuentran limitados por este elemento en primera instancia, relacionado estrechamente, por su valía como nutriente vegetal, su presencia en biomoléculas como proteínas y DNA, y su impacto en la generación de gases de efecto invernadero. Aunque cabe mencionar que, al estar interconectados los ciclos biogeoquímicos, la alteración del ciclo del nitrógeno puede desencadenar la alteración de otros como el del carbono, fósforo o azufre (Gruber y Galloway, 2008).

El ciclaje microbiano del nitrógeno se basa en reacciones de óxido/reducción entre las diferentes especies de nitrógeno. Tradicionalmente, se reconocían tres procesos principales: la fijación de N_2, la nitrificación y la desnitrificación, que se consideran la base de este ciclo. Sin embargo, nuevos datos proponen la existencia de otros procesos poco conocidos que podrían estar actuando de forma alternativa o a la par durante el ciclaje (Stein y Klotz, 2016).

Entre las actividades antrópicas más relevantes que afectan el ciclo del N se encuentran la producción y el uso desmedido de fertilizantes nitrogenados en campos de cultivo debido a la creciente demanda de alimentos. Otra actividad es la asociada a la quema de combustibles fósiles, cuyas emisiones suelen contener especies de nitrógeno que posteriormente pueden ser fijadas en el suelo mediante organismos diazótrofos (43 Tg N por año en sistemas agrícolas), o de forma abiótica mediante descargas eléctricas (estimada en 2.6×10^9 kg N por año en general) (Borucki y Chameides, 1984; Herridge et

al., 2008). Dichos procesos han conllevado a graves consecuencias ambientales entre las que destacan la eutrofización o la acidificación de sistemas terrestres, y la contaminación de cuerpos de agua subterránea, entre otros (Subba Rao et al., 2017).

3.2.2 Nitrificación

La nitrificación es un proceso biológico de generación de energía por algunas bacterias y arqueas, y el cual puede encontrarse en ambientes terrestres, acuáticos y sedimentarios (Schmidt, 2015). Este proceso consiste en la oxidación de amonio a nitrato teniendo como intermediario el nitrito, y es llevada a cabo por bacterias y arqueas (Alexander, 2015). Este proceso suele ser modular y está dividido en dos fases llevadas a cabo por diferentes microorganismos: i) oxidación de amonio a nitrito, y ii) oxidación de nitrito a nitrato; aunque se ha observado que el proceso completo puede ser llevado a cabo por una bacteria y se ha denominado oxidación completa del amonio (comammox, por siglas en inglés de *complete ammonia oxidation*) (Daims et al., 2015).

La nitrificación es de suma importancia en el ciclaje de nitrógeno en el suelo, ya que es el proceso responsable de determinar el balance en la cantidad de amonio y nitrato que son nutrientes esenciales para las plantas. En este sistema, el amonio suele provenir de forma natural de la degradación microbiana de la materia orgánica, la fijación de N_2 por diazótrofos, así como de la hidrólisis de la urea proveniente de la orina animal o directamente por la aplicación de fertilizantes de tipo inorgánico en suelos agrícolas. El nitrato generado por la nitrificación suele ser lixiviado porque su carga suele ser la misma que la de las partículas del suelo, además es soluble en un amplio rango de pH, representando así una pérdida de N del sistema (Prosser, 2014; Sahrawat, 2008).

3.2.3 La oxidación de amonio

La oxidación de amonio (nitritación) es el primer paso de la nitrificación y es reconocida como un paso determinante en la ruta nitrificante, ya que dirige el balance entre el amonio y el nitrito, el cual es limitante para el siguiente paso de la nitrificación. Anteriormente, se pensaba que este proceso estaba restringido a microorganismos aerobios, y por lo tanto era dependiente de la presencia de oxígeno (Beeckman et al., 2018). Sin embargo, desde finales del siglo XX, se descubrió otra ruta de oxidación de amonio. Esta es una ruta anaerobia llevada a cabo por bacterias dentro del filo Planctomycetota (orden Brocadiales), donde la oxidación se realiza usando el nitrato como aceptor electrónico, y la cual es conocida como la oxidación anaerobia de amonio o anammox por sus siglas en inglés (Jetten et al., 1998).

La oxidación aerobia de amonio fue descrita desde finales del siglo XIX, con los aislamientos de bacterias con potencial oxidador de amonio como *Nitrosomonas europaea*, y por mucho tiempo se pensó que dicha ruta estaba restringido a solo bacterias (definidas como Bacterias Oxidadoras de Amonio o AOB) (Lehtovirta-Morley, 2018). Sin embargo, con la caracterización de *Nitrosopumilus maritimus* SCM1, se determinó que también arqueas pueden llevar a cabo este proceso (definidas como Arqueas Oxidadoras de Amonio o AOA) (Morimoto et al., 2011). Las AOB suelen ser proteobacterias pertenecientes a los géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitroglobus*, *Nitrosovibrio, Nitrosoccus* y *Nitrosacidococcus*. Mientras que, las AOA corresponden a arqueas del phylum Crenarchaeota, teniendo como representantes a los géneros: *Candidatus* Nitrosocaldus, *Cenarchaeum*, *Nitrosarchaeum*, *Candidatus* Nitrosopelagicus, *Candidatus* Nitrosotenuis, *Candidatus* Nitrosocosmicus, *Candidatus* Nitrososphaera *y Candidatus* Nitrosotalea (Hatzenpichler, 2012). Estos

microorganismos suelen tener una amplia distribución ambiental, incluyendo sistemas marinos, lacustres, terrestres, y hasta en plantas de tratamiento de agua residual, por lo que tienden a presentar adaptaciones especiales para cada tipo de ambiente.

Las AOA y la AOB realizan entonces el mismo proceso biogeoquímico, aunque existen varias diferencias entre ellas. Por ejemplo, la ruta de la nitritación es diferente entre AOA y AOB, tanto a nivel genético como bioquímico. En el contexto bioquímico, la ruta canónica de las AOB comprende a la hidroxilamina (NH_2OH) como intermediario, y es catalizada por la enzima AMO (monooxigenasa de amonio) que se encuentra unida a la membrana celular. En este caso, la reacción de oxidación requiere de oxígeno molecular (O_2) y $2e^-$ para formar una molécula de hidroxilamina y agua (H_2O). Posteriormente, este compuesto es oxidado por la hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) hacia óxido nítrico (NO) (Soliman y Eldyasti, 2018). La enzima que oxida el NO hacia NO_2^- aún no está bien definida, aunque autores han sugerido que podría ser una enzima cercana a la enzima nitrito reductasa (NirK) (Caranto y Lancaster, 2017). El resultado final de este proceso genera NO_2^- y fuerza protón-motriz. En el caso de las AOA se ha propuesto que el mecanismo de producción de NO_2^-, donde la enzima AMO puede producir hidroxilamina de forma análoga a las AOB, para posteriormente ser transformada por enzimas putativas dependientes de cobre como una oxidorreductasa de hidroxilamina (Cu-HAO) o una reductasa de nitrito (Cu-NIR) (Lehtovirta-Morley, 2018). Sin embargo, se ha hipotetizado que la enzima AMO de las AOA también podría estar generando nitroxilo (HNO) que estaría siendo usado como sustrato para generar N_2O a partir de una oxidorreductasa de nitroxilo putativa (NXOR) (Wu et al., 2020). Asimismo, las AOB son generalmente bacterias autótrofas obligadas y fijan CO_2 atmosférico por la ruta del Ciclo de Calvin–Benson–Bassham. Por otro lado, las AOA pueden ser autótrofas o mixótrofas dependiendo la especie, y estas pueden fijar HCO_3^- por la ruta del Ciclo del 3 Hidroxipropionato–4 Hidroxibutirato, o bien, pueden asimilar pequeñas moléculas orgánicas (Lehtovirta-Morley, 2018).

La enzima AMO es primordial para la nitritación, por lo que es considerada como un marcador primordial para el monitoreo ambiental. El núcleo genético de la enzima AMO está conservado tanto en AOA y AOB, y está compuesto por tres genes: *amoA*, *amoB* y *amoC,* siendo *amoA* el gen codificante para la subunidad funcional de la proteína (**Fig. 2**) (Lehtovirta-Morley, 2018). En el caso de las AOB, el grupo de genes *amoABC* se encuentran de forma continua en su genoma en la misma dirección y pueden estar duplicados en algunas especies (Norton et al., 2002). Para las AOA, la organización de los genes *amoA*, *amoB* y *amoC* es dependiente de la especie, ya que en algunos casos éstos se encuentran agrupados de la forma *amoACB* (estando *amoB* en dirección contraria a *amoA* y *amoC*), mientras que, en otros se encuentran separados por varios genes en la arquitectura del genoma.

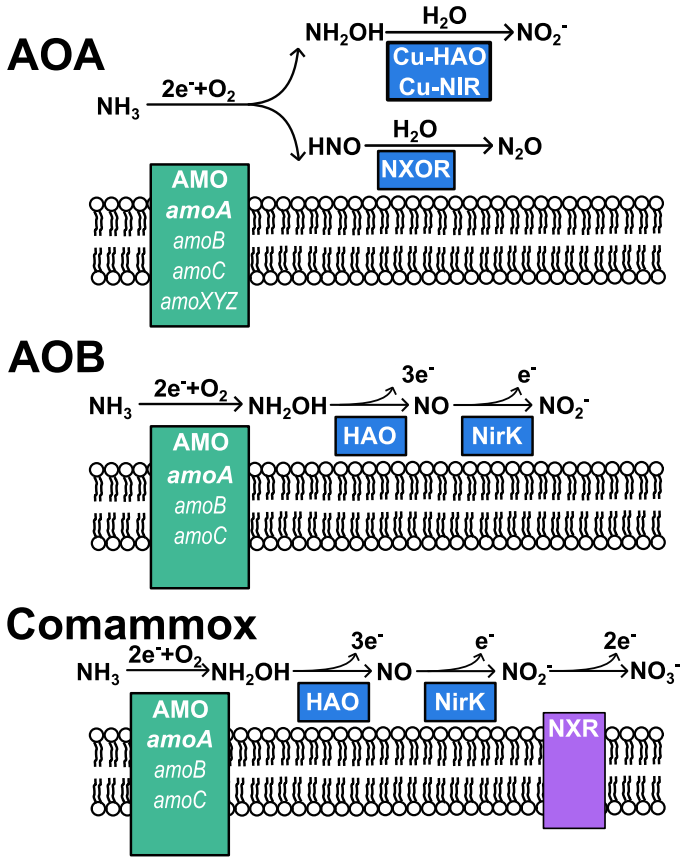

Figura 2 Rutas de oxidación de amonio de arqueas, bacterias y bacterias comammox, sus reacciones, enzimas y genes involucrados. (AMO: Ammonia monooxigenasa, HAO: hidroxilamina oxidorreductasa; NirK: nitrito reductasa, NXOR: oxidorreductasa de nitroxilo putativa)

De igual forma se ha observado que AOA del género *Ca*. Nitrososphaera pueden llegar a poseer hasta seis copias del gen *amoC*. Adicionalmente, recientes estudios han sugerido la presencia de otros genes *amo* dentro de genomas arqueanos. Entre estos se encuentran *amoX, amoY* y *amoZ* que, aunque no se ha comprobado de forma experimental su función, se ha predicho que codifican para hélices transmembrana que podrían estar involucradas en el anclaje del complejo catalítico (Hodgskiss et al., 2023).

Si bien la nitrificación había sido considerada un proceso modular, se había predicho que un organismo que pudiera llevar a cabo la ruta completa, tendría ventajas energéticas sobre aquellos que solo pueden realizar parte del proceso (Costa et al., 2006). Posteriormente fue descubierto que la oxidación completa de amonio (Comammox) puede ser realizada exclusivamente por algunas bacterias del género *Nitrospira* como *Nitrospira inopinata, Nitrospira nitrificans, Nitrospira kreftii,* entre otras (Daims et al., 2015). De igual manera que las AOB, estas bacterias son autótrofas que fijan CO_2 por la vía del rTCA (Ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos) (Lehtovirta-Morley, 2018).

Para el caso de los genes codificantes para la AMO, se ha observado que *amoA* es diferente para AOA y AOB, por lo que forman un agrupamiento diferente en árboles filogenéticos basados en secuencias de este gen. Además, el *amoA* de las bacterias comammox forma dos clados hermanos (clado A y clado B) basado en su filogenia por lo que presentan una gran diversidad propia del taxón (Hu y He, 2017). Cada uno de estos grupos a su vez está conformado por organismos cosmopolitas, que pueden responder de forma diferente a los estímulos ambientales. Esta capacidad de adaptación y respuesta al ambiente las convierte en buenos reporteros biológicos de cambios ambientales.

3.2.4 Factores que influyen en la oxidación de amonio en suelo

La oxidación de amonio es un proceso clave para evaluar el ciclo del N en el suelo, ya que es considerada un paso limitante para la nitrificación. Dicha característica aunada al respaldo bibliográfico ha permitido que sea un buen modelo para estudiar el impacto ambiental del manejo en un sistema como el suelo. Para la oxidación de amonio se han descrito diversos factores antrópicos que pueden influir de manera directa o indirecta en la dinámica del mecanismo. Además, de que se pueden evaluar los efectos de perturbaciones fisicoquímicas y biológicas en dos grupos microbianos diferentes: Archaea y Bacteria. Así, numerosos estudios se han enfocado en establecer el impacto de estas perturbaciones sobre la comunidad oxidadora de amonio, por lo que los marcadores de estudio están bien establecidos.

Una de las variables edáficas más determinantes para los organismos oxidadores de amonio es el pH (Hu et al., 2013). En términos generales se ha establecido que tanto AOA y AOB pueden coexistir en sistemas edáficos con un amplio rango de pH, sin embargo, su abundancia y la estructura de la comunidad varían con relación a éste. Frecuentemente se asocia una mayor abundancia de AOA en suelos que tienen un pH ácido, mientras que las AOB suelen aumentar su número en suelo circumneutral y ligeramente alcalino (Nicol et al., 2008; Shen et al., 2008; Zhang et al., 2012). De forma particular, diversos estudios han demostrado que *Nitrososphaera*, una AOA predominante en suelos, se inclina hacia suelos con condiciones neutras o alcalinas (Gubry-Rangin et al., 2011), caso contrario a la AOA *Nitrosotalea,* que es favorecida en ambientes ácidos (Hu et al., 2015; Zhang et al., 2012). No obstante, otros reportes han observado que la diversidad de las AOB es mayor en comparación a la de las AOA en suelos ácidos fertilizados por largos periodos de tiempo, indicando una mayor resistencia a los cambios de pH que las AOA (Sun et al., 2019).

También se ha observado que la concentración de las especies de nitrógeno biodisponibles es determinante en la conformación y funcionalidad de la comunidad oxidadora de amonio. Aunque el amonio es la materia prima necesaria para llevar a cabo los primeros pasos de la nitrificación, puede resultar inhibitorio en altas concentraciones. En particular, se han observado casos como el de la AOA *Nitrososphaera viennensis*, cuya máxima tolerancia al amonio se aproxima a 15 mM (Stieglmeier et al., 2014); mientras que, bacterias como *Nitrosomonas communis* pueden tolerar hasta 250 mM (Kozlowski et al.,

2016). Con base en ello se generaliza que las AOB dominan en sistemas donde hay grandes entradas de amonio como los suelos agrícolas fertilizados. Mientras que, las AOA suelen estar mejor adaptadas a suelos con concentraciones relativamente bajas de amonio como suelos forestales, ya que tienen una mayor afinidad a éste (Norton y Ouyang, 2019). También el nitrito puede funcionar como agente limitante de la nitrificación. La acumulación de nitrito lleva por lo regular a la activación de una ruta de desnitrificación parcial que genera N_2O (Norton y Ouyang, 2019). En estos casos se ha determinado que arqueas como *Candidatus* Nitrosocosmicus franklandus o *Candidatus* Nitrosotalea devanaterra sólo son tolerantes hasta 50 mM de nitrito (Lehtovirta-Morley et al., 2011, 2016). Sin embargo, cabe recalcar que las adaptaciones a las concentraciones de amonio y nitrito son especie-dependiente.

La salinización de los suelos es otra característica por considerar, sobre todo porque en los últimos años se ha convertido en un problema en los suelos agrícolas. Diversos estudios han identificado la influencia de la salinidad sobre las comunidades microbianas, pudiendo inclusive tener un efecto más catastrófico que los metales pesados (Sardinha et al., 2003). Estudios han observado que algunas sales como el cloruro de amonio en altas concentraciones pueden inhibir hasta el 90% de la nitrificación, sobre todo por los cambios de pH y las presiones osmóticas (Darrah et al., 1987). Además, se ha observado un efecto negativo de la salinización sobre la comunidad nitrificante y su actividad, sin importar la presencia de tratamientos enmendadores (Omar y Ismail, 1999).

Además de lo anterior, el suelo es propenso a recibir contaminantes provenientes de diversas fuentes incluyendo el agua de riego. Entre ellos destacan los metales con efectos inhibitorios de la nitrificación, inclusive en concentraciones cercanas a las normas regulatorias (Dahlin et al., 1997). Aunque, cabe resaltar que el efecto de los metales pesados sobre los organismos nitrificadores es dependiente de la concentración y forma de estos en el medio, ya que bajas concentraciones pueden solo disminuir la actividad enzimática, mientras que superando cierto umbral son completamente inhibitorias (Yan et al., 2013). Se ha observado que metales pesados como el Pb, Cd y Zn en altas concentraciones tienen efectos inhibitorios sobre la oxidación de amonio, y mayormente sobre la oxidación de nitritos (Rother et al., 1982). Aunque se ha propuesto que metales como el Fe, Mn y Zn en ciertas concentraciones pueden mejorar la actividad oxidadora de amonio ya que son aceptores electrónicos o cofactores enzimáticos, e inclusive correlacionarse positivamente con la abundancia de *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (Zhang et al., 2021).

Otros contaminantes emergentes importantes son los fármacos que pueden provenir del riego con agua residual y del uso de estiércol como fertilizante. De manera general, estos compuestos modifican a la comunidad microbiana existente, o como en el caso de los antimicrobianos, pueden generar mecanismos de resistencia. Se ha observado que algunos antibióticos a concentraciones mínimas pueden llegar a inhibir por completo el proceso de nitrificacón como es el caso de la sulfadimetoxina o la tetraciclina (Brown et al., 2019). En contraste, otros fármacos como ivermectina, difloxacino o cloranfenicol en dosis terapéuticas inclusive pueden incrementar la actividad nitrificante de los suelos (DeVries y Zhang, 2016). Dicho efecto podría deberse a un cambio en la comunidad microbiana oxidadora de amonio, aumentando la proporción de AOA sobre AOB (Campos et al., 2001).

El medio abiótico tiene una gran influencia sobre la comunidad nitrificadora, ya que se ha observado que determina desde la estructura de la comunidad hasta la tasa de transformación de sus sustratos (Zhang y Shen, 2019). Esta correlación puede ser aprovechada como herramienta de monitoreo ambiental, sobre todo conociendo los efectos específicos de cada parámetro sobre los microorganismos nitrificadores. Sin embargo,

estos indicadores son indirectos y deben tratarse con cautela ya que hay otros factores compensatorios, como las interacciones con otros organismos, la redundancia funcional o cambios celulares que generan resultados que pueden interpretarse de manera errónea. A pesar de ello, el uso de indicadores microbianos como biodiversidad microbiana o la detección de microorganismos con funciones clave en el sistema mediante herramientas moleculares es una buena opción para el estudio del funcionamiento del suelo (Alkorta et al., 2003; Schloter et al., 2018).

Cabe recalcar que también agentes biológicos como otras bacterias, arqueas, hongos o plantas influyen en la consolidación de la comunidad oxidadora de amonio. Con relación al componente procarionte, esta afectación puede ser por la competencia directa por el aprovechamiento de las fuentes de C y N, sobre todo con organismos heterótrofos como *Pseudomonas.* En el caso de las plantas, la competencia es en torno al amonio disponible, ya que ésta es una de las formas de nitrógeno principales de aprovechamiento vegetal, además del nitrato. Dependiendo de la especie de nitrógeno predilecta por las plantas presentes, será su relación con la comunidad nitrificadora. En el caso de que la planta tenga predilección por el amonio, ésta puede secretar inhibidores para los microorganismos oxidadores de amonio (Subbarao et al., 2013). Si la especie preferida es el nitrato, la planta puede secretar moléculas de carbono al medio para estimular el proceso de formación de nitrato por medio de la nitrificación (Phillips et al., 2011). Además, cabe recalcar que organismos asociados a plantas como hongos micorrízicos también compiten de forma plena por el amonio (Veresoglou et al., 2011), o generan formas inorgánicas aprovechables para los microorganismos oxidadores de amonio, como se ha demostrado para algunas AOA (Courty et al., 2010). Cabe mencionar que la coexistencia entre plantas y microorganismos ha llevado a la coevolución de mecanismos de cooperación y competencia en la captación de nutrientes, por lo que es necesario considerar el componente vegetal para una aproximación más precisa de la dinámica microbiana del suelo.

Los virus también podrían tener una influencia directa sobre los microorganismos oxidadores de amonio, ya que en general son considerados como moduladores de la comunidad microbiana (Wu y Liu, 2009). Se ha observado que AOB como *Nitrospira multiformis* pueden tener integrados en su genoma profagos que pueden activarse ante situaciones de estrés (Choi et al., 2010). Además, se ha detectado de forma indirecta que AOA como *Candidatus* Nitrososphaera evergladensis tienen regiones CRISPR producto de la cercana relación con virus, en especial con el fago de *Helicobacter* phiHP33 (Zhalnina et al., 2014). Finalmente, se ha observado que existe una correlación entre la abundancia viral y la de algunas AOB en sistemas controlados (Brown et al., 2019). En el caso del suelo, se conoce que éste es un gran reservorio de partículas virales, sin embargo, el conocimiento aún es somero sobre las repercusiones reales de éstos en el funcionamiento del suelo.

3.3 Efecto del riego con agua residual en el suelo

3.3.1 Reúso de agua residual con fines agrícolas

Hoy en día, el riego con agua residual es una práctica ampliamente distribuida y existen reportes de su uso en los cinco continentes; no obstante, tiene un especial valor en áreas urbanas o periurbanas y en regiones áridas y semiáridas. El agua residual suele ser de origen urbano e industrial, y puede usarse de forma tratada o cruda. El uso de agua residual tratada (por sus siglas en inglés, *treated wastewater*, TWW) es el estándar recomendado por las diferentes agencias de salud y agricultura, aunque suele enfrentar obstáculos económicos en relación con la infraestructura necesaria para la captación, tratamiento y

distribución (Duong y Saphores, 2015). Por lo anterior, el reúso del agua residual cruda predomina por su costo y su fácil accesibilidad sobre todo en países con pocas posibilidades de invertir en su tratamiento (Scott et al., 2004).

Con base en lo anterior, el poder destinar las aguas residuales para el riego, conlleva a una estrategia de múltiples beneficios. Una de las principales contribuciones es el aporte hídrico para la agricultura, así como para ayudar a disminuir la presión hídrica sobre otras fuentes de agua dulce y su potencial explotación, como el caso de pozos de agua subterránea. También, esta práctica ha ayudado a mitigar el impacto ambiental de los drenajes urbanos, lo cuales son frecuentemente vertidos en cuerpos de agua superficiales ocasionando su contaminación. Con el reúso es posible redireccionar una descarga anual de aproximadamente 400 billones de m^3 que pudiera contaminar más de diez veces su volumen de otros cuerpos de agua (Zhang y Shen, 2019). Además, otra ventaja importante es el aumento en la productividad de los cultivos por la incorporación de nutrientes (C, N, P) y, por lo tanto, la disminución en el uso de fertilizantes químicos, o de forma indirecta, la creación y recarga de acuíferos (El Ayni et al., 2011; Martijn y Redwood, 2005).

Sin embargo, el reúso de esta agua también conlleva consecuencias negativas tanto para el ambiente como para la salud humana. Se ha observado que el constante uso de agua residual en el riego puede llevar a la acumulación de contaminantes como metales pesados, fármacos o microplásticos, así como favorecer la diseminación de organismos patógenos y resistencias a antibióticos (Qadir et al., 2010; Zhang y Shen, 2019). Aunado a lo anterior, también existen estudios que reportan cambios en las propiedades del suelo como variaciones en su pH, almacén de C y N, salinización o cambios en su estructura (Abegunrin et al., 2016; Rusan et al., 2007). Finalmente se ha observado que el uso periódico de agua residual puede llevar a una sobrecarga de nutrientes como especies reducidas de nitrógeno (amonio), cuyo excedente no aprovechado por los cultivos tras su asimilación y transformación en el suelo (oxidación a nitrito/nitrato), puede contaminar mantos acuíferos.

3.3.2 Efecto del agua residual sobre la comunidad microbiana del suelo

Los suelos son sistemas complejos, repositorios de una amplia diversidad biótica que incluye hongos, bacterias, arqueas, protistas y animales. Las comunidades microbianas en particular tienen un núcleo de especies definido que es esencial para el mantenimiento de la estabilidad funcional, y que a su vez se ve soportado por su redundancia funcional (Jiao et al., 2022). Sin embargo, las comunidades microbianas también presentan una capacidad funcional variable que puede responder a cambios en el sistema (Jia y Whalen, 2020).

Estas comunidades son definidas por sus interacciones con el medio abiótico y biótico, entre las que se incluyen factores como la estructura del suelo, las condiciones fisicoquímicas, la humedad o el clima, o las relaciones ecológicas que se dan entre los organismos coexistentes. Sin embargo, el constante uso de agua residual para la irrigación puede ocasionar cambios en la composición y diversidad microbiana del suelo en el corto, mediano y largo plazo. Esto ocurre fundamentalmente por los cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo y al aporte de la microbiota propia del agua residual.

Uno de los riesgos latentes más importantes es la introducción de nuevos microorganismos en el sistema, provenientes del agua de irrigación. Esto podría traer graves problemas, ya que, si el equilibrio que sostiene a la comunidad a través del tiempo se ve comprometido por fenómenos de competencia, podría tener graves consecuencias ecológicas por la sustitución de la microbiota nativa (Becerra-Castro et al., 2015). Sin embargo, la mayoría de las veces no existe un recambio profundo en la microbiota,

probablemente por la adaptación generada por los organismos y la capacidad amortiguadora del suelo (Li et al., 2019; Lüneberg et al., 2018). En particular se observó que la diversidad es un determinante importante en el amortiguamiento de entrada de microorganismos exógenos. Suelos con una baja diversidad son más sensibles a la adición y establecimiento de microorganismos provenientes de aguas residuales (Della-Negra et al., 2024).

No obstante, se ha observado que el uso constante de agua residual puede ocasionar cambios en la microbiota de los suelos irrigados, principalmente por las variaciones en su ambiente fisicoquímico. Entre estos cambios se encuentra el incremento de grupos específicos. Por ejemplo, un estudio demostró que la irrigación continua en cortos periodos de tiempo (150 días) puede incrementar bacterias relacionadas a los géneros *Acinetobacter*, *Legionella* y *Pseudomonas*, así como la detección de *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Clostridium* que han sido identificados como potenciales patógenos humanos (Ibekwe et al., 2018). En periodos de tiempo más largos (alrededor de 100 años) se incrementa la abundancia de bacterias con potencial patogénico relacionadas con el taxón Gammaproteobacteria (Broszat et al., 2014). Aunado a ello, Lüneberg et al. (2018) reportó cómo la calidad del agua de riego influye de manera directa en la estructura y el perfil funcional de la comunidad bacteriana; siendo la humedad del suelo, el contenido de sodio y el pH los principales determinantes del cambio en la comunidad. En relación con los perfiles funcionales, algunos autores no han llegado a observar cambios en suelos regados por 40 años con aguas residuales (Li et al., 2019), aunque otras investigaciones han encontrado un incremento significativo en el número de bacterias nitrificadoras en suelos irrigados con agua residual, mientras que, las bacterias desnitrificadoras han disminuido su abundancia (Ibekwe et al., 2018; Xu et al., 2012).

Otro factor que tomar en cuenta es la introducción de contaminantes como metales o fármacos. En el caso de los fármacos, los más estudiados en las aguas residuales son los antibióticos. De forma general se ha llegado a observar que la irrigación con agua residual incrementa la abundancia de genes de resistencia a antibióticos, y por ende de microorganismos resistentes a antibióticos (Slobodiuk et al., 2021). Esto puede provocar cambios en la estructura de la comunidad y su perfil genético. Por otro lado, se ha sugerido que el tratamiento de las aguas residuales podría atenuar dicho efecto, hasta el punto de no incrementar de forma significante las resistencias a antibióticos (Gatica y Cytryn, 2013). De igual manera se ha observado una correlación entre la introducción de metales pesados desde el agua residual, con la composición y diversidad microbiana de suelos irrigados (X. Xu et al., 2020). Por lo anterior, es necesario llevar a cabo monitoreos para conocer el impacto de esta práctica y conocer su probable influencia en la microbiota del suelo.

3.3.3 Ciclaje de nitrógeno en suelos regados con agua residual

Los cambios en los perfiles funcionales de la comunidad microbiana suelen ser una respuesta al ambiente en el que coexisten (Mansfeldt et al., 2020). De forma específica se ha observado que los cambios en la estructura y diversidad de microorganismos se puede correlacionar con cambios en las propiedades edáficas de los suelos irrigados con agua residual. Para la nitrificación se ha visto que en el corto plazo el uso de agua residual podría no tener un efecto significativo (Liu et al., 2019). Sin embargo, en el largo plazo, cuando el agua residual haya cambiado las propiedades fisicoquímicas del suelo su potencial genético y funcional se aumenta por el incremento en la entrada de amonio y materia orgánica (Ndour et al., 2008). En el caso de la desnitrificación se ha visto que la introducción de contaminantes, y cambios en el pH y las entradas de C y N tienen un efecto directo sobre su funcionamiento, reflejado en su potencial genético (Guo et al., 2013).

El uso de agua residual para la irrigación de parcelas tiende a alterar la concentración de nutrientes propios del suelo, siendo el C y el N aquellos que sufren cambios de mayor magnitud (Friedel et al., 2000; Tsigoida y Argyrokastritis, 2019). Dichas fluctuaciones en la concentración y diversidad de especies de nitrógeno traen consigo cambios en los perfiles metabólicos asociados a ciclajes biogeoquímicos (Leal et al., 2010). En general, se ha observado que la irrigación con agua residual aumenta el potencial nitrificador de suelos agrícolas, y privilegia el establecimiento de grupos relacionados a *Nitrosomonas,* que junto a *Nitrosospira* son los grupos mayoritarios en suelos (Oved et al., 2001). A la par, la acumulación de nitratos provenientes de la oxidación de amonio, o su entrada directa con el agua de riego también puede incrementar el potencial desnitrificador. Además de inducir cambios en la comunidad que lleva a cabo dicho proceso (Wafula et al., 2015). Por lo anterior es necesario comprender el tipo de variación que pueden sufrir organismos relacionados con el ciclaje biogeoquímico por efectos directos e indirectos del reúso del agua residual.

El ciclo del N ha sido alterado por la actividad humana, por ejemplo, el ocasionado por el riego con agua residual, donde uno de los grandes problemas es la alteración por la entrada de nitrógeno al ecosistema. En un esquema general, el agua residual es rica en compuestos nitrogenados dependientes de su origen, siendo el amonio (NH_4^+) la forma más abundante de N en aguas residuales de origen municipal (Sengupta et al., 2015). Durante el riego, una parte del amonio es asimilada directamente por las plantas, mientras que otra parte es oxidada a nitrito (NO_2^-) y posteriormente a nitrato (NO_3^-) en las capas más superficiales del suelo, donde la concentración de oxígeno es mayor (**Fig. 3**). Dicho proceso suele estar gobernado por organismos nitrificadores (Li et al., 2020). Del nitrato generado, una proporción es aprovechada por los organismos presentes, mientras que, los excedentes percolan hacia capas más profundas del suelo. También se ha observado que parte del nitrato puede perderse en forma de gas, principalmente como NOx o N_2 por la acción de organismos desnitrificadores (González-Méndez et al., 2015; Hernández-Martínez et al., 2018). Adicionalmente, se ha sugerido que otros procesos como la oxidación anaerobia de amonio (anammox) podría ser parte de los procesos removedores de nitrato del sistema, sobre todo en la zona vadosa o en suelos inundados con ausencia de oxígeno (Aguilar-Rangel et al., 2020; Nie et al., 2019).

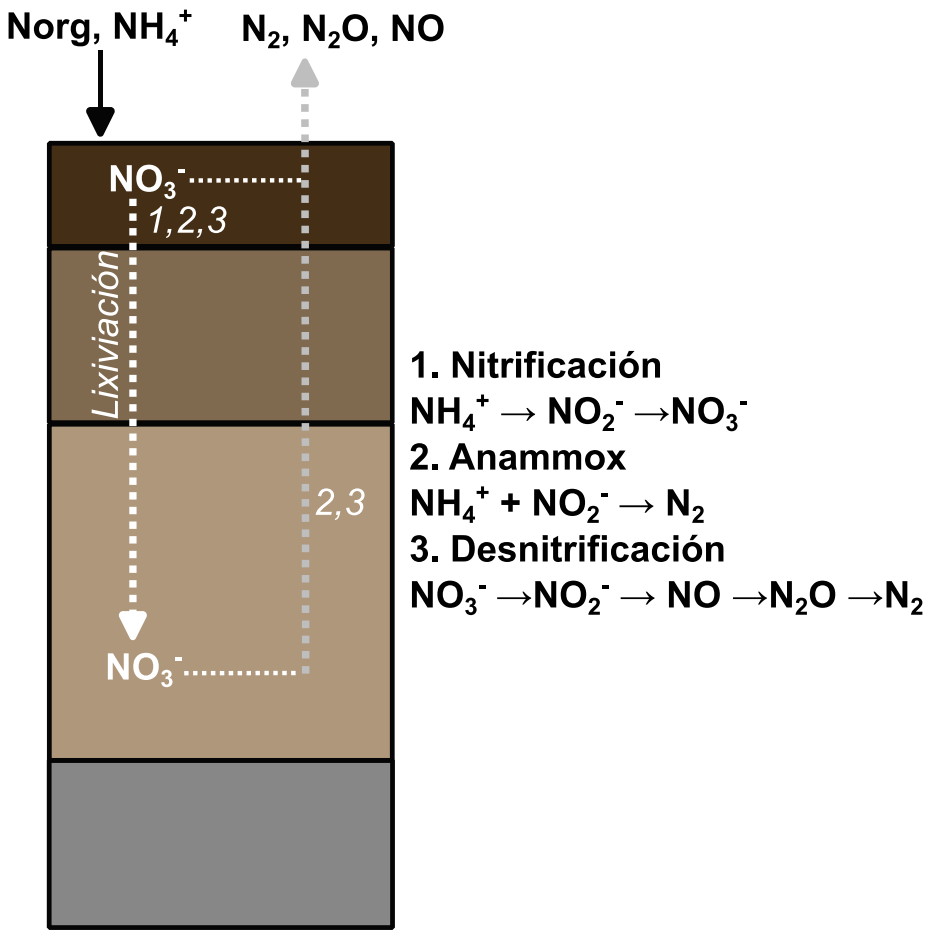

Figura 3 Modelo del ciclaje de nitrógeno en suelo irrigados con agua residual. Basado en Hernández-Martínez et al., (2018).

3.4 El uso de herramientas moleculares para el monitoreo del suelo.

Los índices biológicos son de las variables más importantes en la evaluación de la calidad del suelo. De forma clásica los más estudiados están basados en la participación microbiológica en el sistema, como la biomasa microbiana, respiración del suelo y las actividades enzimáticas (Paz-Ferreiro y Fu, 2016). Sin embargo, la información microbiológica que aportaba dichas pruebas era insuficiente, por sus limitaciones en la identificación de los microorganismos asociados o los mecanismos moleculares involucrados en dichos procesos. Por lo que, fue necesario llevar a cabo diferentes estudios que describieran la biología del sitio de una manera más específica.

Los estudios tradicionales de las comunidades microbianas han permitido conocer el funcionamiento de diferentes sistemas entre los que se encuentra el suelo. Dentro de estos se encuentran análisis dependientes de cultivo como el cultivo, o a la microscopía, tinciones o pruebas bioquímicas como los análisis de actividad mediante la actividad enzimática. Estas técnicas presentan ventajas en cuanto a la identificación de los microorganismos por

su alta resolución en los análisis, y por ello muchas de estas pruebas aún son imprescindibles para la descripción y propuesta de nuevos taxones (Demko et al., 2021). En la actualidad dichas técnicas actualmente aún representan una gran opción en la caracterización de los suelos, o inclusive en el estudio de comunidades microbianas específicas. Sin embargo, estos métodos llegan a presentar algunas limitaciones o sesgos por su limitada cobertura y su enorme esfuerzo de trabajo que podrían influir en la caracterización microbiana del suelo.

Los nuevos avances tecnológicos en el área de biología molecular, principalmente basados en los ácidos nucleicos han aprovechado las deficiencias en las técnicas dependientes de cultivo y se han acoplado a los estudios de ecología microbiana (Ranjard et al., 2000). La inclusión de técnicas como la reacción de cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), y la secuenciación masiva, aunado al mejoramiento en las extracciones de DNA total de muestras ambientales, ha permitido en primera instancia el descubrimiento de nuevos grupos microbianos, genes y rutas metabólicas, datos cuantitativos, así como la exploración de sistemas remotos o inaccesibles entre otras.

Dicha revolución ha sido aprovechada para el monitoreo del componente microbiano del suelo, principalmente en cuanto a su composición y abundancia, ya que ambas son determinantes para evaluar la calidad del suelo. Las principales herramientas moleculares usadas para el monitoreo del suelo incluyen la extracción de los ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación.

La extracción de los ácidos nucleicos es considerada un paso crucial para diversos métodos de la ecología molecular del suelo (Changey et al., 2021). Tanto el DNA como el RNA son moléculas informativas presentes en todas las células, sin embargo, los métodos clásicos de extracción de ácidos nucleicos fueron establecidos para muestras de cultivos microbianos. Por lo que fue necesario desarrollar nuevos métodos para el suelo, ya que al ser una matriz compleja puede contener moléculas como las sustancias húmicas o iones que podrían interferir en la medición o detección del DNA (Lakay et al., 2007). Dichos métodos garantizan la extracción de DNA y RNA total de muestras ambientales con una calidad adecuada para su posterior análisis.

La PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica ampliamente utilizada en diversos campos de la ecología microbiana y a su vez ha sido adaptada a los análisis microbiológicos del suelo. Esta técnica en su variante de punto final involucra la amplificación del número de copias de un fragmento especifico de DNA, que ha sido aprovechado para obtener fragmentos específicos correspondientes a marcadores filogenéticos como el gen del 16S rRNA y que son posteriormente secuenciados.

Además de la PCR de punto final, existe una variante (qPCR) que puede ser acoplada para la cuantificación de objetivos específicos, particularmente de genes funcionales (Fierer et al., 2005). Así, la qPCR (del inglés *quantitative PCR*), es una técnica en la que se puede determinar el número de copias genéticas de una muestra ambiental. Esta variante se ha usado ampliamente en estudios microbiológicos, ya que permite la cuantificación de genes o transcritos presentes en una muestra muchas veces de origen ambiental o médico, sin necesidad de preservar las células (Kim et al., 2013). Esta qPCR puede dividirse en dos tipos con base en el método de detección que usa: SYBR Green o TaqMan. La primera detecta productos de PCR y cuantifica su acumulación conforme a los ciclos determinados, mientras que, la segunda usa sondas específicas para el gen a cuantificar, y con base en ello detecta y cuantifica su acumulación. Esta aproximación ha permitido extrapolar las cuantificaciones absolutas de genes específicos a la actividad específica del gen, informando sobre todo su respuesta a estímulos externos (Postollec et al., 2011).

La secuenciación es un método para determinar la secuencia nucleotídica de los ácidos nucleicos. Diversas técnicas de secuenciación se han desarrollado a partir del método de Sanger que permite la determinación de fragmentos en singular a partir de métodos como el de terminación de cadena y separación por electroforesis, hasta llegar a las técnicas de alto rendimiento que permiten la secuenciación masiva de diversos fragmentos, al mismo tiempo en plataformas de secuenciación con microchips más sofisticados (Mignardi y Nilsson, 2014).

Dentro de las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (por sus siglas en inglés NGS, *next-generation sequencing*), la plataforma Illumina se destaca por su amplia distribución en estudios microbianos. Su universalidad en relación con el número de hebras de DNA a analizar y su relación de costo y beneficio la han vuelto una de las más empleadas en estudios de diversidad microbiana (Caporaso et al., 2012; Wen et al., 2017). Este sistema utiliza la tecnología NGS de secuenciación por síntesis, un método basado en un terminador reversible, que lleva a cabo la extensión por base (sencilla) y la adición competitiva de nucleótidos (Modi et al., 2021). A su vez, esta tecnología puede dividirse en varios sistemas dependiendo del secuenciador utilizado, siendo MiSeq y HiSeq de los más usados, aunque recientemente se añadió NovaSeq, diferenciándose entre sí por cantidad de secuencias obtenidas (Caporaso et al., 2012; Modi et al., 2021). La tecnología MiSeq es de las más ampliamente usadas y genera hasta 15 Gb, traducidas en 25 millones de secuencias sencillas con una longitud máxima de 2 x 300 pb.

Estas tecnologías se han aprovechado para la secuenciación de amplicones provenientes de DNA total, o inclusive se han adaptado para poder secuenciar metagenomas. La secuenciación de amplicones mediante NGS es probablemente de las aplicaciones más usadas y mejor establecidas, sobre todo en la exploración de la diversidad microbiana (Hugerth y Andersson, 2017). Uno de los ejemplos clave en el uso de esta metodología es la secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal (rRNA) (Poretsky et al., 2014). Dicho gen fue desarrollado como marcador molecular para la identificación taxonómica, ya que es ubicuo, conservado, pero con variaciones entre especies y sobre todo brinda una alta reproducibilidad metodológica (Amiteye, 2021). Esto se ha reflejado en proyectos de índole mundial como el *Earth Microbiome Project*, que buscó homologar los estudios de diversidad microbiana y generar un catálogo de ésta a través de las secuencias del gen 16S rRNA (Gilbert et al., 2014). Sin embargo, la secuenciación de amplicones también se puede ocupar en otros genes. Principalmente, se ha aplicado en genes que codifican para proteínas con alguna función específica, aquí llamados genes funcionales. Esto ha ayudado a descifrar el potencial funcional microbiano de diversos sistemas, así como a descubrir la diversidad genética de los genes involucrados en los procesos estudiados. Finalmente, también puede desembocar en aplicaciones biotecnológicas a partir del esclarecimiento de la comunidad y su perfil funcional (Cholet et al., 2022).

De igual forma, las tecnologías de NGS se han adaptado para analizar el conjunto genómico completo de alguna muestra ambiental. La secuenciación de metagenomas ha cobrado importancia en los últimos años debido al mejoramiento en la capacidad de los secuenciadores y el acceso a este tipo de servicios, así como al poder de cómputo necesario para llevar a cabo sus análisis (Taş et al., 2021). Comúnmente los análisis de los metagenomas suelen estar enfocados en 2 vertientes: la estructural y la funcional. El enfoque estructural estudia la estructura de la comunidad microbiana (diversidad y abundancia), sobre todo de aquellos organismos no cultivables. Con base en ello se pueden establecer redes ecológicas o entender el efecto de factores externos sobre una comunidad especifica. Por otro lado, el enfoque funcional se usa para la identificación de genes

involucrados en procesos específicos, y que representan la respuesta funcional de la comunidad ante el ambiente (Alves et al., 2018). Ambos enfoques han permitido el descubrimiento de nuevos microorganismos a partir de la consolidación de genomas ensamblados a partir de metagenomas (MAGs), o inclusive de nuevas rutas metabólicas (Alteio et al., 2020). Sin embargo, el estudio de los metagenomas aún tiene problemas a diferentes niveles, como los metodológicos con relación a la calidad del DNA (DNA fragmentado) y la calidad de la secuenciación, o los de análisis, ya que gran parte de los genes encontrados corresponden a secuencias cuya función aún es desconocida o con alguna propuesta putativa (Cowan et al., 2005).

En general, los avances logrados con la incorporación de dichas técnicas han permitido simplificar el proceso de obtención de datos, pero sobre todo han llevado al descubrimiento de nuevos taxones y metabolismos que podrían tener una gran influencia sobre los procesos del suelo.

3.5 Valle del Mezquital y su relación con el agua residual

El Valle del Mezquital es una región semiárida de amplio aprovechamiento agrícola que se ha beneficiado de las descargas de aguas residuales provenientes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México por más de un siglo. Ésto debido a que más del 70 % de las aguas residuales generadas por los habitantes de la cuenca de México desembocan en esta área (Lesser et al., 2018). Este aprovechamiento aunado a su localización, han llevado a los distritos de riego del Valle del Mezquital a ser la zona más amplia regada con agua residual del mundo, abarcando alrededor de 90,000 ha (Vázquez-Salvador et al., 2020).

Dichas características han hecho del Valle del Mezquital un lugar óptimo para el estudio de la influencia del agua residual sobre el suelo agrícola, y otros factores correlacionados. Los estudios pioneros se llevaron a cabo para estudiar las propiedades del agua y sus potenciales efectos sobre los suelos nativos, los cuales indicaron los riesgos potenciales por la alta cantidad de solidos disueltos, metales, surfactantes o microorganismos con potencial patógeno (Urroz, 1977). Posteriormente, otros estudios confirmaron la presencia de otros contaminantes como compuestos orgánicos volátiles como fenol o tolueno, o metales. Además de una amplia variedad de fármacos entre los que se destacan antibióticos, hormonas, analgésicos entre otros (Lesser et al., 2018). De igual manera se estableció un vínculo entre el uso del agua residual por parte de la comunidad y la presencia de enfermedades entéricas como la diarrea (Contreras et al., 2017).

Aunque bajo otra perspectiva se ha establecido que el agua residual es rica en compuestos ricos en nitrógeno, fósforo, potasio, cobre, hierro y zinc. Estos compuestos en conjunto pueden actuar como nutrientes ayudando a reducir la necesidad de fertilizantes (Pérez Díaz et al., 2018). Ésto ha llevado a un incremento significante en la fertilidad de algunos suelos de la región, significando mayores rendimientos (Ponce-Lira et al., 2020). Lo anterior ha derivado en un constante desarrollo económico en las regiones irrigadas con agua residual, en comparación con aquellas que se mantienen con manejos de temporal (Durán-Álvarez et al., 2021).

Otra perspectiva en los análisis en la región está enfocada en el efecto directo del uso del agua residual sobre los suelos. Primeramente, algunos estudios sostienen que el uso del agua residual ha llevado a un mejoramiento en la estructura del suelo, y que podría funcionar como un filtro natural para los microorganismos patógenos y otras sustancias contaminantes como detergentes provenientes de los efluentes (Naranjo Pérez de León y Biswas, 1997). Además de aportar al almacén de carbono, ya que la acumulación de años

bajo este manejo incrementa el contenido de carbono orgánico total y el disuelto (Siebe y Fischer, 1996). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios se han enfocado en identificar las posibles consecuencias del uso de agua residual sobre sus suelos agrícolas.

Con el tiempo, el riego con agua residual ha llevado a la acumulación de una gran variedad de contaminantes en los suelos agrícolas del Valle del Mezquital. Uno de los más importantes es la acumulación de metales pesados como el cobre, plomo, zinc entre otros en los suelos irrigados (Cajuste et al., 1991). Aunado a ello, algunos autores han encontrado que algunos metales pesados terminan siendo absorbidos por el tejido vegetal de los cultivos propios de la zona como la alfalfa o el maíz, superando los límites permisibles por las normas locales (Mireles et al., 2004). Asimismo, en las últimas décadas se ha destacado la acumulación de fármacos en el suelo, específicamente de antimicrobianos. Diversos estudios han reportado la acumulación de antibióticos como ciprofloxacino o sulfametoxazol, así como de genes de resistencia asociados a éstos (Dalkmann et al., 2012). Dicho incremento en la abundancia de los genes de resistencia a antimicrobianos, en conjunto con el aumento de patógenos potenciales en los suelos agrícolas representan una fuente de riesgo a la salud de los habitantes de la zona (Broszat et al., 2014).

Con relación a lo anterior, se ha observado que el uso de agua residual en el Valle del Mezquital no solo ha impactado el suelo, sino también cuerpos de agua subterránea. En general, gran parte de los contaminantes se acumulan en los suelos irrigados, aunque se ha llegado a detectar la presencia de fármacos como la carbamazepina o el sulfametoxazol en pozos de uso doméstico (Lesser et al., 2018). De igual forma se ha detectado una acumulación de nitratos producto de la oxidación del amonio proveniente de las aguas residuales (Hernández-Martínez et al., 2018). Esta contaminación por nitratos puede llegar a derivar en enfermedades como la metahemoglobinemia, resultando en un riesgo indirecto del uso del agua residual para el riego (Li et al., 2021).

4 Justificación

La escasez de agua y la demanda de este recurso a futuro han llevado al establecimiento de estrategias como el uso de agua reciclada para el riego agrícola. Se prevé que el reúso del agua residual en zonas agrícolas será cada vez más común en zonas áridas y semiáridas. Así, diversos estudios se han centrado en determinar el impacto de esta práctica en la salud humana o ambiental, o por descargas en otros sistemas acuáticos (Cifuentes et al., 2000; Downs et al., 1999; Siebe y Cifuentes, 1995). Sin embargo, los análisis de las consecuencias del uso del agua residual a largo plazo son pocos, en especial los enfocados a comunidades microbianas que realizan procesos clave en los ciclos de los nutrientes como el N y P. Uno de los nutrientes más importantes en el suelo es el nitrógeno (N), el cual puede ser introducido al suelo en forma de fertilizante o como parte de los nutrientes en el agua de riego con agua reclamada, donde promueve los procesos de nitrificación. En específico, se ha observado que la aplicación constante de agua residual a suelos agrícolas incrementa la abundancia de las comunidades oxidadoras de amonio del suelo; sin embargo, poco se sabe de los cambios en la diversidad y abundancia de estas comunidades en el largo plazo.

Además, los estudios sobre el efecto de la irrigación en distritos de riego en México en las comunidades microbianas son escasos, y se desconoce el efecto que tendrá el cambio del uso del agua residual a tratada en la irrigación de suelos agrícolas en las comunidades microbianas del suelo, sobre todo en las relacionadas al ciclo del nitrógeno, como las oxidadoras de amonio. Los suelos del Valle de Mezquital son ejemplo de una zona agrícola con una larga historia de riego con agua residual que llega a casi 100 años bajo esta práctica, donde la constante adición de nutrientes ha impulsado los procesos de nitrificación. A la fecha se ha observado cómo el riego en campo incrementa la actividad nitrificante (Hernández-Martínez et al., 2018), y cómo los suelos regados por casi 100 años con agua residual tienen un mayor potencial de nitrificación que suelos de la zona regados con agua de pozo (Lüneberg et al., 2018). Sin embargo, poco se sabe de la diversidad y abundancia de las bacterias nitrificantes en estos suelos, sus cambios derivados del riego a largo plazo y sus posibles cambios por el empleo de agua tratada.

A la fecha, existen varios estudios que describen metodologías para determinar la actividad nitrificante del suelo, sin embargo, con el avance tecnológico se ha replanteado el panorama para su análisis. La inclusión de las técnicas moleculares para la cuantificación de genes y estudios metagenómicos asociados a procesos biogeoquímicos y como análogos, podría atraer ventajas como la propia identificación de los microorganismos responsables.

Para llenar este hueco de información en el conocimiento, el presente estudio plantea estudiar a los microorganismos oxidadores de amonio en suelos del Valle del Mezquital, desde una perspectiva de cambio de uso de suelo con base en el tiempo que han sido regados con agua residual. Para ello se empleará una cronosecuencia de riego con agua residual (0, 25, 50 y 100 años) y se estudiarán los cambios en la diversidad y abundancia de la comunidad nitrificadora mediante el uso de marcadores filogenéticos. Asimismo, se empleará una estrategia metagenómica para conocer de forma más amplia este potencial genético.

5 Hipótesis

Para el presente proyecto, se presentan tres hipótesis de trabajo:

1. Conforme se incrementen los años bajo riego con agua residual en un suelo, la diversidad de oxidadores de amonio (bacterias y arqueas) decrecerá, pero su abundancia relativa y potencial genético (como cuentas del gen *amoA*) aumentará.

2. El uso de herramientas metagenómicas permitirá la identificación de grupos oxidadores de amonio que no fueron detectados mediante la secuenciación de amplicones de los genes *amoA* y 16S rRNA. Además, permitirá una mayor profundidad en la definición taxonómica de los grupos oxidadores de amonio.

3. El riego continuo con agua de la planta de tratamiento de Atotonilco (PTAR-A) en suelos con 100 años de riego involucrará una disminución en el aporte de carbono y nitrógeno al sistema, afectando la estructura y abundancia de las comunidades microbianas involucradas en la oxidación de amonio.

6 Objetivos

6.1 General

Determinar el efecto que ha tenido el riego con agua residual sobre la abundancia y diversidad de las comunidades oxidadoras de amonio de los suelos agrícolas del Valle del Mezquital a largo plazo, y sus posibles modificaciones ante el cambio de la calidad del agua usada para el riego.

6.2 Específicos

I. Identificar suelos agrícolas irrigados con aguas residuales por diferentes periodos de tiempo (25, 50 y 100 años), así como un sitio de temporal (0 años) que no haya sido irrigado previamente, para determinar de forma gradual los cambios en las comunidades oxidadoras de amonio producto del uso de agua residual en los suelos agrícolas.

II. Determinar los cambios en la diversidad, estructura y composición de la comunidad oxidadora de amonio de suelos agrícolas producto del tiempo que han sido irrigados con agua residual.

III. Identificar los cambios en la composición y abundancia de los organismos involucrados en el ciclaje de nitrógeno en la cronosecuencia usando herramientas metagenómicas.

IV. Evaluar los cambios en la estructura y composición de la comunidad oxidadora de amonio de suelos irrigados por 100 años con agua residual después de cambiar la calidad de agua de riego por agua de la planta de tratamiento Atotonilco.

7 Antecedentes

El Valle del Mezquital es una extensa zona semi-árida que abarca alrededor de 90,000 ha localizada al norte de la Ciudad de México. Dicha región ha recibido las descargas de agua residual (60 m^3/s) provenientes de la Zona Metropolitana del Valle de México por más de 100 años a la fecha, por lo cual se considera uno de los casos de reúso de agua residual urbana más antiguos (Jiménez y Chávez, 2002). Su sistema de distribución y almacenaje se basa en 9 presas y 850 km de canales abiertos que abarcan toda la región (Lesser et al., 2018). La gran mayoría de esta agua (alrededor del 70%) no ha recibido ningún tratamiento o solo tratamientos primarios, ya sea mediante sedimentación en presas o mediante transporte (Jiménez et al., 2001).

Sin embargo, a finales de la década pasada entró en funcionamiento una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en la región. Dicha planta tiene capacidad nominal de 35 m^3/s, con una máxima capacidad de hasta 50 m^3/s (García-Sánchez y Güereca, 2019). El objetivo de dicha planta es el de tratar alrededor del 60 % de los flujos provenientes del emisor oriente de la Ciudad de México para usarla después en el riego agrícola. Así, la finalidad de la PTAR es remover sólidos y patógenos, pero conservar los nutrientes disueltos mediante dos tipos de tratamientos: i) coagulación, floculación y sedimentación, y ii) tratamiento biológico mediante lodos activados, ambos seguidos por una etapa de desinfección mediante cloración (Rodríguez-Varela et al., 2021).

El uso de esta agua residual está ampliamente distribuido y ha permitido el establecimiento agrícola en la zona, ya que además de resolver el estrés hídrico, el agua es rica en materia orgánica y formas reducidas de N funcionando como fertilizante. Los principales cultivos corresponden a forrajes como la alfalfa y maíz, aunque de igual forma se producen frijoles, tomates, cebollas o chiles, entre otros (Lesser et al., 2018). Sin embargo, el uso continuo de esta agua conlleva riesgos ambientales y para la salud humana de forma directa e indirecta. Se ha reportado que el uso continuo ha llevado a la salinización del suelo (Ramirez-Fuentes et al., 2002), así como a la acumulación de contaminantes como metales y fármacos (Carrillo et al., 2016; Siebe, 1995). Estos efectos pueden representar una amenaza a la salud humana en el mediano y largo plazo. Además, el contacto directo del agua residual con los agricultores y la comunidad en general ha acarreado problemas gastrointestinales como diarreas por el contacto directo con patógenos entéricos (Contreras et al., 2017). Sin embargo, el efecto que tiene sobre otros componentes del suelo como la microbiota aún es ampliamente desconocido, aunque estudios ya comienzan a dar respuesta a estas preguntas.

Estudios previos describieron la correlación existente entre la calidad de agua usada para el riego y la comunidad microbiana que habita el suelo. En primer lugar, se sabe gran parte de la carga microbiana proveniente del agua residual es filtrada por el suelo, ya que ésta no tiende a infiltrarse en mantos acuíferos subterráneos (Chávez et al., 2011). Posteriormente, se observó que el uso de agua residual para el riego puede incrementar hasta casi 27% la abundancia relativa de Proteobacteria, incluyendo patógenos potenciales como *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Broszat et al., 2014). De forma más amplia, igualmente se descubrió que el tipo de agua usada para el riego tiene un efecto significante sobre la estructura de la comunidad bacteriana y fúngica (Lüneberg et al., 2018, 2019), asociados a cambios fisicoquímicos del suelo. En estos estudios se analizó el efecto de irrigar los suelos mediante agua de lluvia (temporal), con agua de pozo o con agua residual, sobre la composición, diversidad y funcionalidad microbiana.

Dentro de los cambios en el perfil funcional, probablemente los más estudiados en la zona corresponden a resistencias a antimicrobianos. En ellos se observa un incremento en la abundancia de genes *sul1* (resistencia a sulfonamidas) en hasta dos órdenes de magnitud en suelos irrigados por 100 años en comparación con aquellos de temporal (Dalkmann et al., 2012). Mientras que, en un estudio más reciente se observó un incremento en los genes *intI1* (asociado a genes que confieren resistencia a antibióticos, desinfectantes y metales pesados)*, qacE* (resistencia a desinfectantes)*, aadA* (resistencia a estreptomicina y espectinomicina)*, korB* (asociado a plásmidos propios de sistemas alterados) y *tetW* (gen de resistencia a tetraciclinas) en suelos irrigados por 100 años con agua residual (Jechalke et al., 2015). Dichos cambios en el perfil funcional en relación con la resistencia contra antimicrobianos se han correlacionado con la acumulación de fármacos como el ciprofloxacino, sulfametoxazol y la carbamazepina, entre otros productos de la irrigación con agua residual (Dalkmann et al., 2012).

Por otro lado, también fueron propuestos cambios en el perfil funcional relacionados con el ciclaje biogeoquímico del suelo. Una predicción que toma como base secuencias del gen 16S rRNA sugiere un ligero decremento en procesos de descomposición de la lignina y quitina, sin embargo, la mayor diferencia recayó sobre el ciclaje de nitrógeno. En particular se predijo un incremento en la nitrificación en suelos irrigados con agua residual en comparación con los suelos nativos o de temporal (Lüneberg et al., 2018). Lo anterior, se ve relacionado con la constante entrada de nitrógeno, en formas reducidas (amonio) y orgánicas provenientes del agua de riego.

Anteriormente, se había sugerido la nitrificación como un proceso microbiano importante sobre todo en los eventos de riego. En ellos se describió que la irrigación con agua residual aportar entre 500 – 700 kg/ha de N en un ciclo anual, siendo 40 % la fracción orgánica y un 60 % en forma de amonio. En un evento de riego el aporte individual de las especies de N se ha calculado entre 26 – 30 mg/L de N-NH_4^+ y 20 – 27 mg/L de N orgánico. Estas cargas de N son rápidamente transformadas a nitrato en los primeros centímetros del suelo, esto se debe a la entrada constante de amonio en un sistema aerobio propicio para la oxidación biológica de este (Shen et al., 2014). Posteriormente, el nitrato generado percola a través del suelo hacia la zona saturada (Hernández-Martínez et al., 2018).

Actualmente, pocos estudios se han enfocado en estudiar el efecto del agua residual sobre el perfil funcional involucrado en el ciclaje biogeoquímico. Particularmente, se ha estudiado el efecto que puede llegar a presentar en suelos irrigados con agua reclamada, sin embargo, al variar el contenido de amonio se espera un resultado diferente con base al tratamiento que sufrió esta clase de agua (Li et al., 2019). A la fecha, poco se sabe del efecto del agua residual cruda sobre la comunidad oxidadora de amonio en cuanto a estructura, abundancia de diferentes taxones y diversidad.

De igual forma, el efecto sobre la comunidad oxidadora de amonio que podría desencadenar el uso de agua tratada en suelos regados con agua residual es aún escasa. En particular, se propone que la introducción de una planta de tratamiento de aguas residuales puede significar cambios en el corto y largo plazo sobre la comunidad microbiana. Esto se debe a que esta cambiaría las propiedades del agua de riego, llevando a una disminución en la entrada de nutrientes al suelo o la carga microbiana, entre otros. Aunque se espera que los cambios en las propiedades del suelo y su microbiota producto del riego con esta agua reclamada no sean inmediatos (Vázquez-Salvador et al., 2020).

8 Materiales y métodos

Para el presente proyecto se establecieron varias estrategias acordes a los objetivos específicos planteados (**Tabla 1**).

Tabla 1. Relación entre los objetivos particulares de investigación, estrategia metodológica y los análisis propuestos para el presente trabajo de investigación

Objetivo específico	Estrategia	Desarrollo experimental
1. Identificar los sitios de muestreo que representen suelos que hayan sido regados con agua residual por 25, 50 y 100 años, así como un sitio de temporal (0 años) que no haya sido previamente regado con agua residual.	Muestreo de una cronosecuencia basada en la antigüedad de riego con agua residual en el Valle del Mezquital con fines comparativos en los cambios de las comunidades amonio oxidadoras.	• Muestreo. • Caracterización fisicoquímica (pH, conductividad eléctrica, C y N, y algunos metales totales). • Estadística descriptiva.
2. Determinar los cambios en la diversidad, estructura y composición de la comunidad oxidadora de amonio de los suelos de estudio.	Caracterización y exploración de las comunidades oxidadoras de amonio mediante amplificación y secuenciación masiva de genes *amoA*.	• Obtención de DNA total de suelos de la cronosecuencia. • Amplificación y secuenciación de fragmentos del gen 16S rRNA y *amoA*. • Análisis de secuencias: diversidad alfa y beta, y asignación taxonómica. • Análisis estadísticos comparativos.
3. Identificar los cambios en la composición y abundancia de los organismos involucrados en el ciclaje de nitrógeno en la cronosecuencia usando herramientas metagenómicas.	Detección y caracterización de secuencias relacionadas con la oxidación de amonio en suelos de la cronosecuencia.	• Obtención de cuatro metagenomas acorde a la cronosecuencia de estudio. • Identificación de comunidades oxidadoras de amonio.
4. Determinar los cambios en la estructura y composición de la comunidad oxidadora de amonio suelos irrigados por 100 años con agua residual después de riegos continuos con agua de la planta de tratamiento Atotonilco.	Experimento de riego continuo de columnas inalteradas, empleando tres suelos regados por ~100 años, y bajo riegos continuos empleando agua residual y agua de la planta de tratamiento de Atotonilco.	• Montaje de experimento y riegos continuos. • Amplificación y secuenciación de fragmentos del gen 16S rRNA. • Análisis de secuencias: diversidad alfa y beta, y asignación taxonómica. • Análisis estadísticos comparativos.

8.1.1 Sitio de estudio

Los sitios de muestreo se encuentran localizados en la región conocida como Valle del Mezquital. Esta zona se encuentra en el altiplano mexicano, a 60 km al norte de la Ciudad de México en el estado de Hidalgo. El valle se encuentra a una altura entre los 1700 – 2100 m s.n.m. dentro de las coordenadas 20º 07' N, 99º 14 O. Tiene un clima predominantemente semiárido con índices de aridez entre 0.23 – 0.41. Su precipitación anual promedio se encuentra entre los 450 – 700 mm, limitada a una temporada que abarca entre mayo y octubre. La zona suele presentar altas tasas de evapotranspiración. Su temperatura anual promedio es entre 15 – 17 ºC, con diferencias entre verano e invierno entre los 5 – 6 ºC (Durán-Álvarez et al., 2021; González-Méndez et al., 2015). La vegetación nativa suele estar representada por flora xerofítica, principalmente en forma de arbustos espinosos como *Prosopis* spp., *Acacia* spp. y *Mimosa* spp., o matorrales rosetófilos como *Agave lechuguilla*, *Agave striata* y *Hechtia podantha* (Abd El-Ghani et al., 2017).

Sin embargo, desde principios del siglo XX ha habido una transformación a suelos agrícolas de práctica intensiva, producto del riego con agua residual proveniente de la Ciudad de México. El agua residual es transportada en grandes canales abiertos sin tratamientos previos, a excepción de la sedimentación propia del transporte. Posteriormente, el agua es distribuida por una extensa red de canales secundarios a través de las parcelas. El riego de las parcelas se da mediante inundación, con láminas entre 1500 – 2000 mm por año dependiendo del cultivo y tipo de suelo, siendo entre 170-210 mm por evento de riego. Cabe recalcar que, en las regiones más socialmente marginales aún persiste agricultura de temporal, que solo depende del agua de lluvia. La producción agrícola de la zona comprende cerca de 90,000 ha, estando restringida al cultivo de forrajes, principalmente maíz y alfalfa (Durán-Álvarez et al., 2021; González-Méndez et al., 2015).

8.1.2 Muestreo de suelos en una cronosecuencia de antigüedad de riego

Para determinar el efecto paulatino que ha tenido el constante uso de agua residual sobre la comunidad oxidadora de amonio en suelos agrícolas, se muestreó una cronosecuencia de suelos (objetivos 1, 2 y 3). Esto se logró aprovechándose de la expansión de la infraestructura de distribución del agua residual en el Valle del Mezquital. La cronosecuencia estuvo integrada por suelos previamente clasificados como feozems encontrados en el distrito de riego Tula-03 en el Valle del Mezquital. Los suelos seleccionados han sido regados por 25, 50 y 100 años con aguas residuales provenientes de la zona metropolitana de la Ciudad de México. Adicionalmente se colectaron suelos que tienen manejo de temporal (0 años). En la **tabla 2** se pueden observar la localización de las parcelas ocupadas para el presente experimento.

Tabla 2. Localización de las parcelas correspondientes a la cronosecuencia de estudio.

Tiempo de muestreo	Coordenadas		
Parcela (P)	Latitud	Longitud	Localidad, Municipio
0 años			
P1	20° 9' 48.45" N	99° 6' 25.76" O	Santiago Tezontlale, Ajacuba
P2	20° 9' 42.74" N	99° 6' 25.29" O	
P3	20° 9' 37.49" N	99° 6' 24.99" O	
25 años			
P1	20° 2' 24.63" N	99° 11' 38.52" O	Texas, Atotonilco de Tula
P2	20° 2' 24.05" N	99° 11' 35.15" O	
P3	20° 2' 23.47" N	99° 11' 33.40" O	
50 años			
P1	20° 2' 21.49" N	99° 11' 56.38" O	San José Bojay, Atitalaquia
P2	20° 2' 18.10" N	99° 11' 59.29" O	
P3	20° 2' 23.14" N	99° 11' 54.40" O	
100 años			
P1	20° 7' 29.08" N	99° 12' 47.80" O	Tlahuelilpan, Tlahelilpan
P2	20° 7' 30.01" N	99° 12' 51.23" O	
P3	20° 7' 33.68" N	99° 12' 48.60" O	

El muestreo se llevó a cabo en febrero del 2020, definiendo tres parcelas continuas sin cobertura vegetal para cada tiempo de la cronosecuencia. Para cada parcela se llevó a cabo un muestreo compuesto para asegurar la representatividad de la muestra. Para ello se trazaron cuatro transectos longitudinales y paralelos por cada parcela. En cada transecto se tomaban pequeños núcleos superficiales (0 -10 cm) de suelo usando un nucleador cada 10 m. Por parcela fueron obtenidos entre 25 - 33 núcleos, que posteriormente fueron mezclados en contenedores asépticos, y mantenidos a 4 ºC en oscuridad para su transporte hasta el laboratorio.

Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente y a la sombra. Luego se le retiraron partículas mayores como basura, rocas o restos vegetales (raíces, hojas y tallos) mediante tamizaje, usando un cedazo de 2 mm. Las muestras tamizadas fueron homogenizadas y divididas. Una parte fue almacenada a -20 ºC para posteriores análisis moleculares, y la otra parte fue procesada para los posteriores análisis fisicoquímicos.

8.1.3 Experimento de riegos continuos de columnas inalteradas de suelo

Para determinar el efecto de cambiar la calidad del agua de riego sobre la comunidad microbiana de suelos regados por un aproximadamente siglo con agua residual, se

recolectaron columnas inalteradas de suelo, previamente clasificados como feozems que han sido regados por 100 años con agua residual de 3 localidades distintas dentro del distrito de riego Tula-03. Las localidades seleccionadas fueron: Bojayito (B), Ulapa-Tetepango (UT) y Las Palmas (LP). De cada localidad fueron obtenidas 6 columnas, extraídas de forma continua en 2 parcelas (3 columnas por parcela). Las parcelas de las cuales fueron obtenidas las columnas contenían una cobertura vegetal de alfalfa, en estado joven para B y UT, mientras que en LP la alfalfa ya estaba en un estadio maduro.

Las columnas inalteradas fueron colectadas en marzo del 2022. Cada columna de suelo fue esculpida en campo tratando de no alterar la estructura del suelo. Estas fueron contenidas en cilindros de acero, de 30 cm de largo por 15 cm de diámetro, y fueron almacenadas a 4 ºC en completa oscuridad y transportadas al laboratorio para su posterior establecimiento.

Establecimiento de columnas y mantenimiento

Las columnas fueron acondicionadas en el invernadero del Instituto de Geología de la UNAM. Allí, éstas fueron colocadas sobre una base que permitiera la salida de los lixiviados, dejando 4.5 cm entre el límite superior de la muestra de suelo y el de la columna. Posteriormente, las columnas recibieron un riego de adaptación con $CaCl_2$ 0.01 M, y fueron divididas de acuerdo con el siguiente diseño experimental (**Fig. 4**):

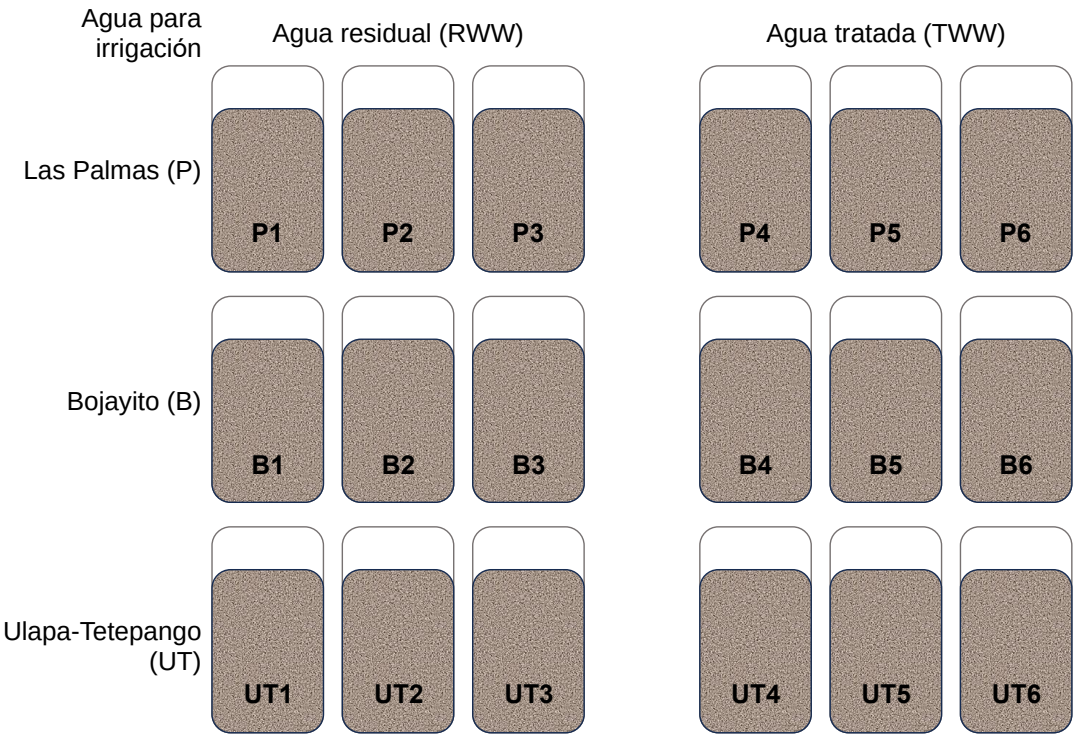

Figura 4 Diseño experimental para el experimento de columnas.

Las columnas fueron regadas cada 10 días con 800 mL de agua residual y agua tratada por la PTAR-A según el caso, en 18 ocasiones. Al séptimo día posterior a cada riego se tomaron muestras de suelo superficial de alrededor de 5 g por columna, para posteriormente ser utilizadas en análisis de biología molecular. Estas se obtuvieron raspando la parte superficial del suelo, y depositando este suelo en tubos estériles de almacenamiento cónicos de 15 ml. En particular los análisis de biología molecular se realizaron con las muestras correspondientes a los riegos 0 (R0, condiciones iniciales), 3 (R3), 8 (R8), 12 (R12), 15 (R15) y 18 (R18). Mientras que, para los análisis fisicoquímicos fueron tomadas muestras de suelo previo al inicio del experimento (R0) y después de los 18 eventos de riego (R18).

El agua utilizada para las columnas fue recolectada de forma directa en el municipio Atotonilco de Tula, Hidalgo. El agua residual fue tomada justo en la parte continua exterior del influente de la PTAR de Atotonilco en la localidad de San Antonio (19° 57' 11.196" N, 99° 17' 49.495" O). El agua tratada fue recolectada en el municipio de San José Acoculco (19° 58' 17.04" N, 99° 18' 8.87" O) en un canal que procede del efluente de la PTAR-A, donde se mezcla el agua tratada de la planta y el agua no tratada. El agua fue transportada en bidones de plástico y almacenada en oscuridad a 4 ºC. El tiempo máximo de almacenaje de las aguas usadas para el riego fue de 20 días. Las características de las aguas de riego se encuentran en el **Anexo A1**.

8.1.4 Caracterización fisicoquímica del suelo

Para llevar a cabo los análisis fisicoquímicos, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente en un sitio sin luz directa por 72 h, para posteriormente ser homogenizadas y tamizadas en una malla metálica de 2 mm. Los análisis de pH y conductividad eléctrica (CE) fueron llevados a cabo en las muestras previamente secadas utilizado el método de extractos saturados basado en los métodos de (Sparks, 1996).

Para la determinación del Carbono Total (Ct), Carbono Orgánico (Corg) y Nitrógeno total (Nt), las muestras fueron pasadas nuevamente por una malla metálica de 0.180 mm. Para el Ct y el Nt, las muestras fueron cuantificadas directamente mediante un analizador elemental 2400 Series II CHNS (PerkinElmer). En el caso del Corg primero se llevó a cabo la remoción de carbonatos usando HCl 5N, posteriormente se llevó la determinación.

La determinación de los metales (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn) se llevó a cabo en muestras previamente digeridas con HNO_3 (J.T. Baker 69 - 70%) y HCl (J.T. Baker 36.5 - 38%) mediante un ICP-OES (Perkin Elmer ICP-OES Optima 8300).

8.1.5 Extracción de DNA y amplificación de genes de interés

El DNA total de las muestras fue extraído usando el kit PowerSoil DNA isolation Kit de Qiagen a partir de 0.25 g de suelo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones en el volumen de elución final (50 μL). La concentración resultante del DNA obtenido fue obtenida usando el kit Qubit dsDNA HS Assay en el fluorómetro Qubit 4, ambos de Thermo Fisher Scientific. Posteriormente, la muestra fue diluida en muestras de trabajo en concentraciones alrededor de 10 – 12 ng/μL en volúmenes de entre 50 y 60 μL, para su almacenamiento a -20 ºC hasta su uso.

Para analizar la comunidad microbiana en general, se utilizó el amplicón que codifica para la región V4 del gen 16S SSU rRNA. El amplicón fue conseguido con base en los protocolos sugeridos por el *Earth Microbiome Project*, usando los cebadores 515F/806R

con un adaptador MiSeq en la región reversa y un protocolo de amplificación ya reportado (Caporaso et al., 2012). Mientras que, para investigar los cambios en la comunidad oxidadora de amonio fue seleccionado el gen *amoA,* tanto para Archaea, como para Bacteria. El gen fue amplificado usando los cebadores Arch-amoAF/Arch-amoAR para Archaea y amoA-1F/ amoA-2R para Bacteria, *amoA* con adaptadores MiSeq en la región reversa (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes de interés

Gen Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm ºC	Referencia
rrn-16S rRNA				
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	290	50	Caporaso et al., 2012
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT			
amoA AOA				
Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635*	53	Francis et al., 2005
Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT			
amoA AOB				
amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	490*	60	Rotthauwe et al., 1997
amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			

***** Este tamaño se incrementa si se usan cebadores con adaptadores MiSeq para la secuenciación masiva del gen, (incremento aproximado de 70 pb).

Para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos génicos mediante PCR punto final se prepararon reacciones individuales de PCR de 25 μL teniendo como base la siguiente fórmula (**Tabla 4**):

Tabla 4. Composición de las reacciones de PCR punto final empleadas.

Componente	Concentración final
DNA templado	~ 15 ng por reacción
Buffer de PCR libre de Mg^{2+} (Takara Bio Inc)	1x
$MgCl_2$	1.5 – 2 mmol/L
Cebadores	0.4 μM por cada uno
Trifosfato de desoxinucleósido (DNTPs)	200 μM
Dimetilsulfóxido (DMSO)	5%
Polimerasa ExTaq (Takara Bio Inc)	1 U

A partir de la mezcla para reacción anterior, los protocolos de amplificación consistieron en: i) una fase inicial de desnaturalización del DNA templado, seguido de ii) 35 ciclos de alineamiento y amplificación, entre los que se encuentran un ciclo de desnaturalización a 95 ºC por 1 min, seguido de un ciclo de alineamiento y un ciclo de extensión a 72 ºC por 1 min, y finalmente iii) un ciclo general de extensión a 72 ºC por 10 min. Cabe recalcar que la temperatura y tiempo de alineamiento de los cebadores para 16S rRNA y *amoA* eran específicos para cada gen, siendo de 30 s para 16S rRNA y de 60 s para los *amoA* de AOA y AOB (**Tabla 3**). Todos los amplicones fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Los amplicones de 16S rRNA y *amoA* para secuenciación, fueron purificados usando el sistema de purificación de perlas Agencourt AMXPure PCR (Beckman Coulter), y cuando se notaron bandas inespecíficas, por gel de agarosa al 2% usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Finalmente, los amplicones correspondientes al gen 16S rRNA fueron secuenciados de forma pareada utilizando la plataforma Illumina MiSeq en el Yale Center for Genome Analysis de la Universidad de Yale. Mientras que, los amplicones de *amoA* de AOA y AOB fueron procesados mediante el kit Nextera XT Index de Illumina para indexarlos de forma dual, siguiendo las condiciones del fabricante realizando (*i.e*., un segundo PCR con ocho ciclos), y finalmente volvieron a ser purificados y diluidos usando Tris 10 mM (pH 8.5) y agrupados a una concentración equimolar de 9 pM. Los amplicones de *amoA* fueron secuenciados de forma unitaria, solo siendo analizados los que se encuentran en dirección 5' → 3' en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida. En este caso de igual forma se usó la plataforma MiSeq con el kit MiSeq Reagent kit V3 de Illumina.

8.1.6 Análisis de las secuencias

Gen 16S rRNA

Las secuencias correspondientes al gen 16S rRNA fueron procesadas usando el paquete DADA2 de R (Callahan et al., 2016). Dichas secuencias al ser pareadas fueron primeramente evaluadas en cuanto a calidad de forma separada utilizando la instrucción "plotQualityProfile". A partir de los resultados obtenidos de forma particular, fueron decididos los parámetros para el filtrado y corte de las secuencias mediante el comando "filterAndTrim". Las secuencias preprocesadas fueron concatenadas y sometidas a una remoción de quimeras mediante "removeBimeraDenovo". Posteriormente fueron sometidas a la asignación taxonómica tomando como referencia la base de datos SILVA 138 (Quast et al., 2012; Yilmaz et al., 2014). Finalmente, fueron construidos árboles filogenéticos usando el paquete Phangorn a partir del alinemiento producido por el paquete Decipher, ambos con R. Los árboles generados fueron basados en el método de *Neighbor Joining.*

Gen *amoA*

Para el procesamiento y análisis de las secuencias de *amoA* provenientes de la secuenciación masiva de amplicones por metabarcoding, se utilizó de igual manera el paquete DADA2 de R (Callahan et al., 2016). En este caso en específico, el procesamiento fue llevado a cabo de forma sencilla en la hebra *forward.* Fueron 314,755 lecturas obtenidas de ambos genes *amoA* provenientes de la secuenciación. La calidad de las secuencias sencillas fue analizada usando "plotQualityProfile", y posteriormente con "filterAndTrim" fueron removidas las secuencias de baja calidad y recortada la secuencia correspondiente

a los adaptadores para su secuenciación masiva (250 pb). Finalmente, fueron retiradas las secuencias quiméricas mediante la instrucción “removeBimeraDenovo”.

Posterior al procesamiento de calidad resultaron en 144,696 lecturas que se pudieron agrupar en 300 secuencias representativas únicas. Las secuencias resultantes fueron posteriormente curadas de forma manual para retirar todas aquellas secuencias codificantes que no estuvieran relacionadas al gen *amoA.* Posteriormente, para estandarizar el número de lecturas mínimas para AOA y AOB fue realizada una rarefacción de las secuencias usando la herramienta “rarefy_even_depth” del paquete “Phyloseq” de R (McMurdie y Holmes, 2013). El número de secuencias obtenidas y resultantes posterior a la rarefacción fue de 1,446 cuentas para AOA, y 2,587 para AOB. Posteriormente fueron agrupadas las secuencias en un porcentaje de identidad del 95% basado en el reporte de Yu et al. (2016). Estos OTUs fueron obtenidos a partir de la herramienta q2-vsearch contenida en la plataforma QIIME2 (Bolyen et al., 2019).

La aproximación taxonómica de las secuencias se realizó mediante cercanía basada en la identidad de las secuencias. Primeramente, las secuencias fueron alineadas usando el método MUSCLE en el software SEAVIEW (Edgar, 2004; Gouy et al., 2010). A partir del alineamiento múltiple, fueron generados un par de árboles. El primer árbol fue construido con base en el algoritmo Neighbor Joining a partir de una matriz de distancia obtenida por el modelo Jukes-Cantor, y que sería ocupado para los análisis de alfa y beta diversidad. El segundo fue generado mediante un algoritmo modificado de Neighbor Joining conocido como BIONJ (Bio Neighbor Joining). En este caso el árbol fue construido usando el método de distancia Kimura two-parameter (K2P) con 1000 iteraciones.

8.1.7 Cuantificación de los genes *amoA y 16S rRNA*

Los genes *amoA* de AOA y AOB fueron cuantificados usando la técnica de la PCR cuantitativa. A la par también fue cuantificado el gen 16S rRNA, para ser utilizado como control constitutivo. Todos los genes fueron cuantificados en muestras de DNA total de suelo teniendo en cuenta su concentración exacta, así como el volumen del cual fue extraído.

El DNA total fue utilizado como templado para generar amplicones a través de PCR punto final utilizando los cebadores de la **tabla 3**, que servirían para generar la curva estándar necesaria para la cuantificación. Estos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa para confirmar que fueran una banda única, posteriormente purificados mediante. Posteriormente fueron cuantificados y diluidos serialmente en razón 1:10.

La cuantificación génica fue llevada a cabo en un termociclador StepOne Real-time PCR System de Thermo Fisher Scientific, usando la tecnología de SYBR Green. Cada reacción constaba de 10 μL y fue preparada de la siguiente manera (**Tabla 5**):

Tabla 5. Composición de las reacciones de PCR en tiempo real.

Componente	Concentración final
DNA templado	1 ng
Buffer Premix Ex Taq Bulk (Takara Bio Inc)	1X
Tinte de referencia ROX (Takara Bio Inc)	1X
Conjunto de cebadores	0.2 μmol/L

Para la amplificación fue añadido un control negativo en la placa. El programa de amplificación/cuantificación consistió en: i) una primera fase de desnaturalización a 95 ºC por 5 min, seguida de ii) una fase de alineamiento y cuantificación que consistía en 40 ciclos de 95 ºC por 1 min, la temperatura de alineamiento por 1 min y una fase de extensión de 72 por 1 min. Posterior, a los cuarenta ciclos fue incluido un nuevo programa donde se aumentaría de forma escalonada la temperatura para generar una curva de fusión para asegurar la presencia de solo un tamaño de amplicón y con ello confirmar la especificidad de la prueba. El programa consistió en: i) ciclo sencillo de desnaturalización a 95 ºC por 15 s, seguido por ii) un aumento gradual de 0.5 ºC cada 15 s, iniciando en 60 ºC y terminando en 95 ºC.

8.2 Procesamiento, secuenciación y análisis de los metagenomas

Se obtuvieron cuatro metagenomas representativos de la cronosecuencia. Para ello, muestras de pools de DNA procedente de las tres parcelas representativas por cada tiempo. El DNA se extrajo acorde a lo reportando en la sección 6.1.5, y se envió a secuenciación a la compañía de Macrogen (República de Corea del Sur). Las librerías se prepararon por el secuenciador empleando kits TruSeq nano DNA library (350 bp) y se secuenciaron de forma *paired-end* por la plataforma NovaSeq, 150bp PE, ~10Gb por muestra. Los archivos en crudo fueron analizados.

8.2.1 Análisis de secuencias obtenidas de los metagenomas

Primeramente, fue evaluada la calidad de las secuencias crudas mediante la herramienta FastQC de forma pareada (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). A partir del reporte generado de forma individual, fueron evaluadas las variables de calidad por secuencia de bases, por contenido en su secuencia de bases y el número de N contenidas en las secuencias principalmente. Los estadísticos resultantes fueron tomados en cuenta para el filtrado de calidad mediante la herramienta Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)., fijando la calidad de las secuencias en 30, y realizando un corte en la posición 1 en las lecturas *forward* y en la posición 10 en las lecturas *reverse*, para asegurar el recorte de adaptadores que pudieran permanecer en las secuencias. Finalmente, fue revisado que éstos no contuvieran N en su contenido.

Posteriormente, las secuencias pareadas fueron concatenadas usando la herramienta shuffleSequences de MetaVelvet para crear un nuevo archivo que contuviera las lecturas *forward* y *reverse* (Namiki et al., 2011). Estas secuencias fueron posteriormente formateadas para transformar las salidas fastq en fasta mediante fq2fa. Los concatenados pre-ensamblaje fueron utilizados como base para la aproximación taxonómica, llevada a cabo por el programa Kaiju (Menzel et al., 2016a). A partir de los archivos generados se obtuvieron documentos visuales que pueden ser analizados mediante Krona (Ondov et al., 2011), así como nuevas salidas con formato de datos separados por tabulaciones. La clasificación obtenida de Kaiju fue analizada mediante Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) para conocer la composición microbiana de los sitios.

Estas secuencias filtradas y concatenadas fueron usadas como base para el ensamblaje metagenómico, usando la opción metagenómica de SPAdes: metaSPAdes, y MEGAHIT (D. Li et al., 2015; Nurk et al., 2017). Para el caso de metaSPAdes, fueron realizados diversos ensamblajes usando por lo menos 12 k-meros por corrida para cada muestra. Para MEGAHIT los ensamblajes fueron llevados a cabo usando 11 k-meros. Al final, la calidad

de los ensamblajes fue evaluada mediante la herramienta QUAST. Los reportes de dicha herramienta eran de modo comparativo, por lo que fueron definitivos en la elección del mejor ensamblaje basado en los k-meros usados (**Anexo A2**). Dicha elección fue tomada en consideración del ensamblaje que presentara un N50 mayor, el mayor número de contigs y que estos fueran de gran tamaño. En la **tabla 6** se observan cuáles fueron los k-meros que arrojaban un mejor ensamblaje para cada muestra.

Tabla 6. K-meros seleccionados para el ensamblaje metagenómico.

Ensamblador Muestra	K-meros utilizados
metaSPAdes	
0 años	23,31,39,49,63,73,87,97,105,113,121,127
25 años	23,27,35,45,51,63,73,87,95,103,117,125
50 años	23,27,35,45,51,63,73,87,95,103,117,125
100 años	23,31,39,49,63,73,87,97,105,113,121,127
MEGAHIT	
0 años	27,37,47,57,67,77,87,97,107,117,127
25 años	27,37,47,57,67,77,87,97,107,117,127
50 años	27,37,47,57,67,77,87,97,107,117,127
100 años	27,37,47,57,67,77,87,97,107,117,127

Para la búsqueda masiva de genes relacionados a la oxidación de amonio se adaptó la herramienta ABRicate (https://github.com/tseemann/abricate), usando bases de datos de genes pertenecientes al clúster génico *amoABC* de AOA y AOB. Dichas bases de datos fueron creadas para el presente trabajo a partir de secuencias obtenidas de genomas de referencia, o de genomas completos e incompletos de AOA y AOB reconocidos. Todas las secuencias genómicas fueron obtenidas del GenBank del National Center for Biotechnolgy Information (NCBI) de la National Institutes of Healt (NIH), y la longitud de los genes integrados en la base de datos oscilaba entre 80 - 100% del tamaño esperado del gen.

Las búsquedas con ABRicate fueron divididas a su vez en dos. La primera fue llevada a cabo usando las secuencias procesadas no ensambladas para poder identificar la diversidad general del gen, manteniendo el parámetro estándar de identidad en 80% y ajustando la cobertura mínima en 10%. La segunda búsqueda fue llevada a cabo usando los ensamblajes, manteniendo los estándares de identidad y ajustando la cobertura en 40%. Lo anterior generó una base de datos de la que se pudo rastrear y extraer fragmentos génicos $\geq$ 40% del tamaño original del gen en cuestión, y que serían usados para evaluar la diversidad intergénica dentro de las diferentes muestras analizadas.

A partir de los archivos de salida de ABRicate, se pudo conocer la localización de las secuencias del gen *amoA* dentro de los concatenados y ensamblajes. Estas fueron obtenidas mediante el comando “grep”, curadas y colocadas en la misma dirección (5’ $\rightarrow$ 3’). Las secuencias obtenidas fueron analizadas a la par con las secuencias previamente obtenidas mediante secuenciación de amplicones.

La base de datos conjunta fue complementada con las secuencias *amoA* provenientes de los genomas de referencia del NCBI. Estas fueron alineadas de forma múltiple mediante el método MUSCLE en Seaview (Edgar, 2004; Gouy et al., 2010). Posteriormente, se elaboró un árbol filogenético de Bio-Neighbor Joining como fue previamente descrito.

8.3 Análisis estadísticos

El índice de diversidad de Shannon-Weaver fue calculado a partir de las secuencias procesadas de 16S rRNA y *amoA* en el programa de Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013). Dicho análisis fue llevado a cabo a partir de las cuentas por ASV u OTU mediante la función "estimate_richness" del paquete Phyloseq en R. De igual manera se utilizó el paquete Phyloseq en R para llevar a cabo análisis multivariados basados en la métrica de distancia UniFrac ponderado mediante la ordenación del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Los análisis de CCA se llevaron a cabo con la paquetería "Vegan" de R usando la función "cca", y mediante la función "envfit" se filtraron los parámetros fisicoquímicos no significantes con una p.max de 0.05.

9 Resultados

9.1 Cambios en la estructura de la comunidad oxidadora de amonio debido a la irrigación con agua residual por largos periodos de tiempo.

9.1.1 Alteraciones en el ambiente fisicoquímico del suelo

Para este estudio fue establecida una cronosecuencia de suelos regados por 25, 50 y 100 años con agua residual, así como un control que corresponde a suelos de temporal que no han tenido contacto con agua residual. Para cada tiempo evaluado fueron seleccionadas tres parcelas contiguas, cuyos suelos habían sido previamente clasificados como feozems vérticos o háplicos.

De forma general, se observaron cambios en los parámetros fisicoquímicos con relación a los suelos que habían sido regados con agua residual o no (**Fig. 5**). El pH se incrementó de forma significativa después del uso de agua residual yendo de un promedio de 7.70 en suelos de temporal, a 8.51 en suelos regados por 100 años con agua residual. En la conductividad eléctrica (CE) se pudo observar un fenómeno similar. En cuanto al contenido de carbono total (Ct) este casi se duplicó después de la aplicación de aguas residuales, caso que de igual forma se ve reflejada en su fracción orgánica (Corg). En ambos casos, el incremento tuvo su pico máximo en los suelos irrigados por 50 años, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los suelos irrigados. La cantidad de nitrógeno total (Nt) también se incrementó, aunque de forma gradual hacia los 50 años de riego, teniendo su pico en 100 años.

Finalmente, para conocer la influencia de los contaminantes en el medio se realizó el cálculo de un índice de toxicidad (IT) basado en Azarbad et al. (2013). Este se basa en la concentración de metales presentes en el medio (**Anexo A3**). En él se puede observar la acumulación constante de metales a través de los años de riego. Particularmente, el índice indica que hacia los 100 años de riego la acumulación de metales es casi siete veces mayor a cuando no ha sido regado con agua residual.

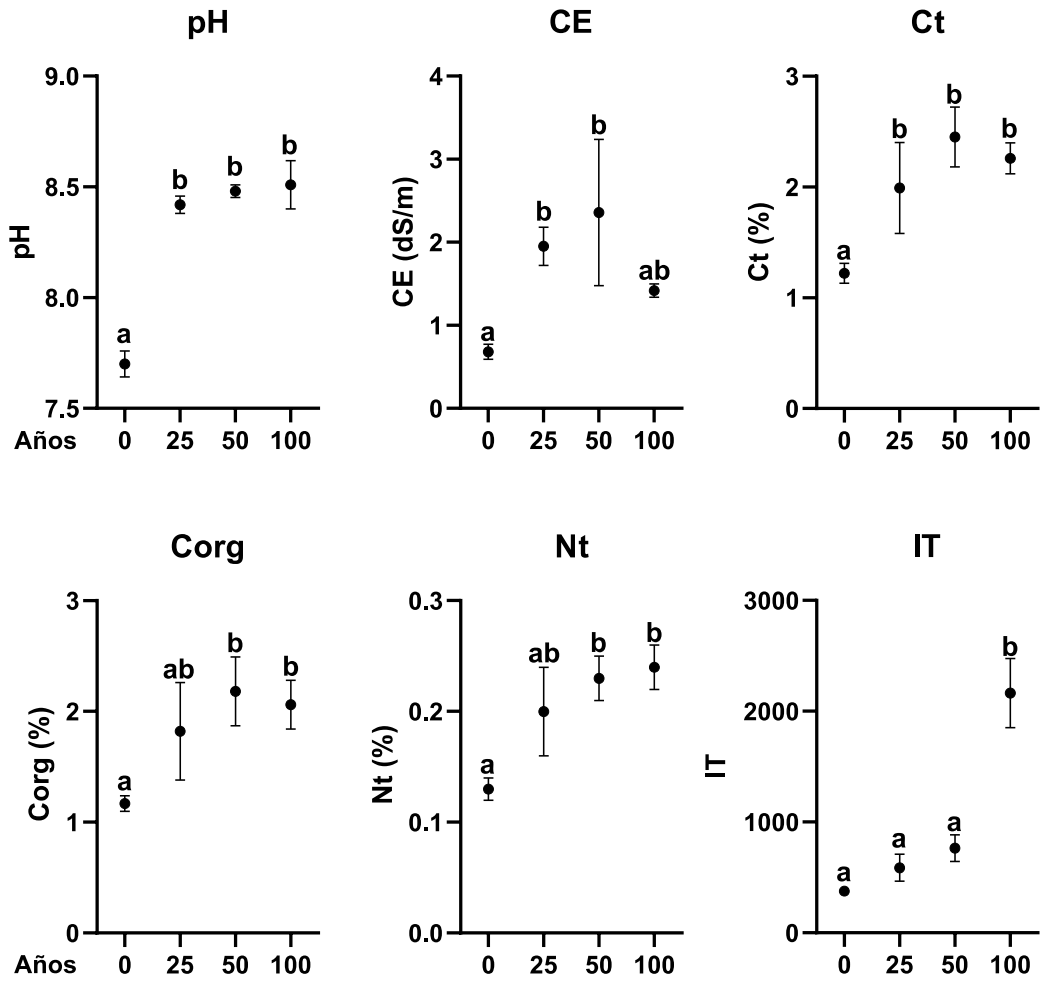

Figura 5. Propiedades fisicoquímicas de los suelos estudiados. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p<0.05$). Prueba de Kruskal-Wallis

9.1.2 Cambios en la abundancia de los oxidadores de amonio en una cronosecuencia

Los cambios en la abundancia de los microorganismos oxidadores fueron abordados desde dos perspectivas: una basada en la secuenciación del gen 16S rRNA, y otra absoluta en la que fueron cuantificados los genes *amoA*.

La aproximación relativa del gen 16S rRNA mostró la presencia de grupos arqueanos (AOA) y bacterianos (AOB) en todos los suelos estudiados. En cuanto a las AOA, los grupos asociados pertenecieron al filo Crenarchaeota y fueron delimitados a los géneros *Candidatus* Nitrocosmicus y *Candidatus* Nitrososphaera, así como a otras arqueas no cultivables de la clase Nitrososphaeria y la familia Nitrososphaeraceae (**Fig. 6a**). La abundancia de éstas en los suelos de temporal (0 años) en promedio no superaba el 7.5%. Mientras que, posterior al uso de agua residual la abundancia de estas se incrementó por encima del 12% en todos los suelos regados con agua residual, teniendo su máximo en los suelos regados por 50 años con un pico de más del 15%. Por otro lado, entre las AOB

potenciales se incluían aquellas que pertenecían a la familia Nitrosomonadaceae, así como a las del género *Nitrospira* que son conocidas como bacterias comammox (**Fig. 6b**). En general, la abundancia relativa de AOA se incrementó gradualmente posterior al uso de agua residual para irrigar desde alrededor de 1.1% hasta 1.9%. siendo que la presencia de grupos como *Nitrosomonas* es más notable en los suelos que fueron irrigados, mientras que, *Nitrosospira* se incrementó hacia los últimos años de riego (50 y 100 años).

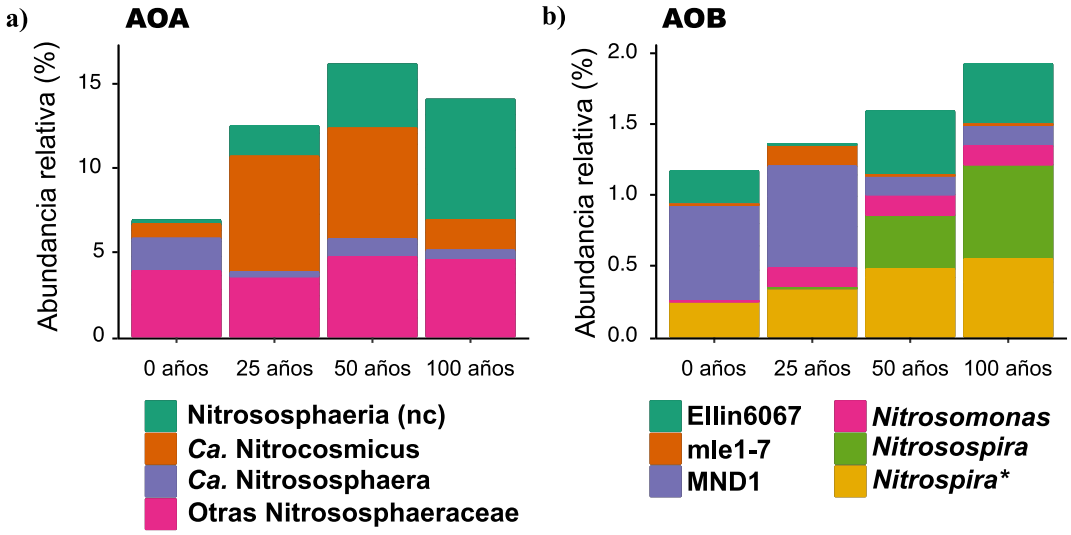

Figura 6. Abundancias relativas de potenciales grupos oxidadores de amonio basadas en su abundancia relativa acorde a las secuencias 16S rRNA. a) Arqueas oxidadoras de amonio, b) bacterias oxidadoras de amonio. *Grupo asociado a comammox, (nc) = no cultivable.

Las variaciones en la abundancia absoluta de los genes *amoA* de AOA y AOB mostraron un comportamiento similar a la abundancia obtenida en la cuantificación del gen 16S rRNA. En ambos casos, el número de copias se incrementó con la acumulación de riegos con los años (**Fig. 7**). Para las AOA, las secuencias *amoA* se incrementaron en promedio por encima de las 7×10^6 copias/g de suelo en los suelos regados por 50 años, siendo éste el tiempo con el mayor número de copias y siendo significativamente diferente a las muestras de 0 y 25 años. Para las AOB, las copias *amoA* se incrementaron de forma gradual, iniciando en menos de 4×10^5 copias/g de suelo en los suelos de temporal y terminando en más de 2×10^6 copias/g de suelo en los suelos regados por 100 años.

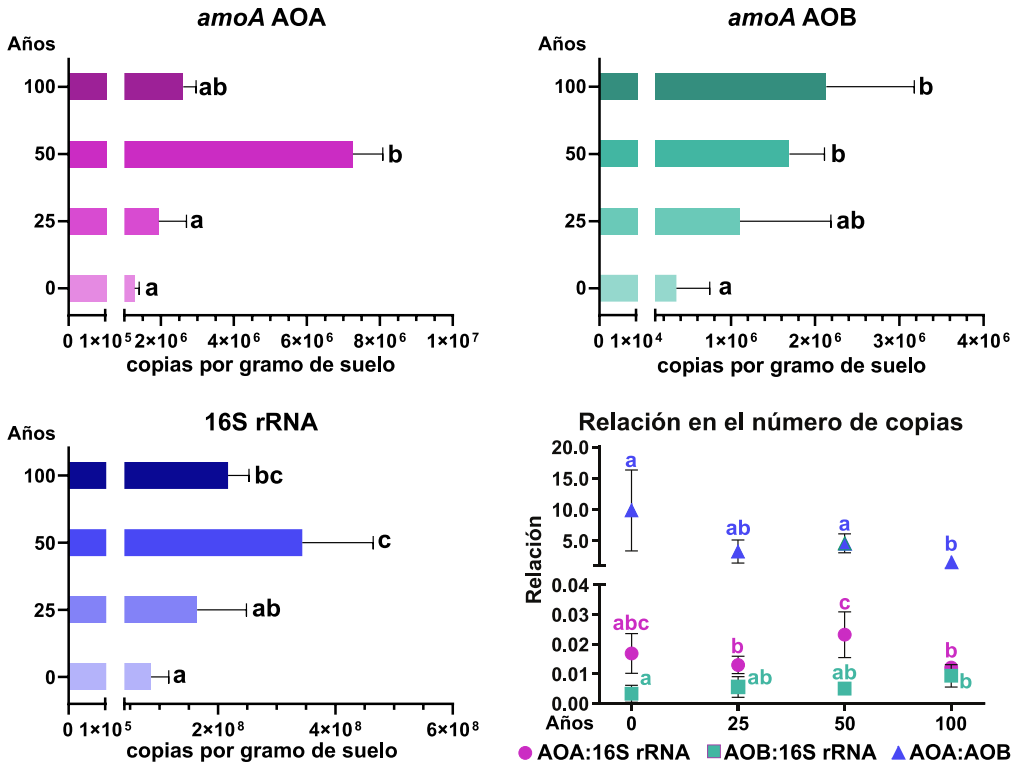

Figura 7. Abundancia absoluta de los genes *amoA* de AOA y AOB, y 16S rRNA en suelos regados con agua residual por diferente tiempo, y las relaciones entre el número de copias de cada gen. Letras diferentes expresan diferencias significativas ($p<0.05$) de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis.

A la par, se cuantificó el gen 16S rRNA como control nativo de la comunidad microbiana en general, además de ser considerado como una aproximación de la biomasa procarionte. Con base en dicha cuantificación, se puede observar un incremento en la abundancia general del componente microbiano en los suelos regados con agua residual, siendo los suelos regados por 50 y 100 años significativamente diferentes a los suelos de temporal (**Fig. 7**). En particular se observa que en los suelos de 50 años es donde hay una mayor abundancia procarionte en comparación con los otros suelos regados con agua residual. Dicha abundancia fue tomada en cuenta para calcular la proporción de AOA y AOB sobre la comunidad procarionte. Con relación a las AOA, ésta tuvo un incremento significativo a los 50 años, mientras que, para las AOB el crecimiento con base en el gen 16S rRNA se mantiene gradual, siendo los suelos con 100 años estadísticamente mayores a los suelos de temporal. Finalmente, en la proporción de AOA:AOB en los diferentes suelos se denota una disminución en la razón de estos de casi 10 AOA por cada AOB en los suelos de temporal hasta 1.6 AOA por cada AOB en los suelos regados por 100 años (**Fig. 7**).

9.1.3 Cambios en la diversidad y estructura de la comunidad oxidadora de amonio

Para evaluar el efecto del riego con agua residual sobre la comunidad oxidadora de amonio se llevó a cabo una secuenciación de amplicones realizada a los genes *amoA* de AOA y AOB en los suelos de la cronosecuencia. Producto de la secuenciación se pudieron

obtener 154 secuencias únicas pertenecientes al gen *amoA* asociado a AOA, y 112 para AOB. Estas fueron colapsadas al 95% de identidad (Yu et al., 2016), resultando en 22 OTUs arqueanos y 30 bacterianos. El índice de diversidad de Shannon fue calculado para AOA y AOB con base en los resultados anteriores. Se puede observar que AOB posee una mayor diversidad que AOA (**Fig. 8**). En concreto, se observó que la diversidad de los oxidadores de amonio no cambia en relación con el tiempo que ha sido usada el agua residual para el riego, ya que solo decrece de forma significativa a los 25 años para AOA y AOB, sin embargo, existe una ligera tendencia de incremento de la diversidad de AOB hacia los 100 años.

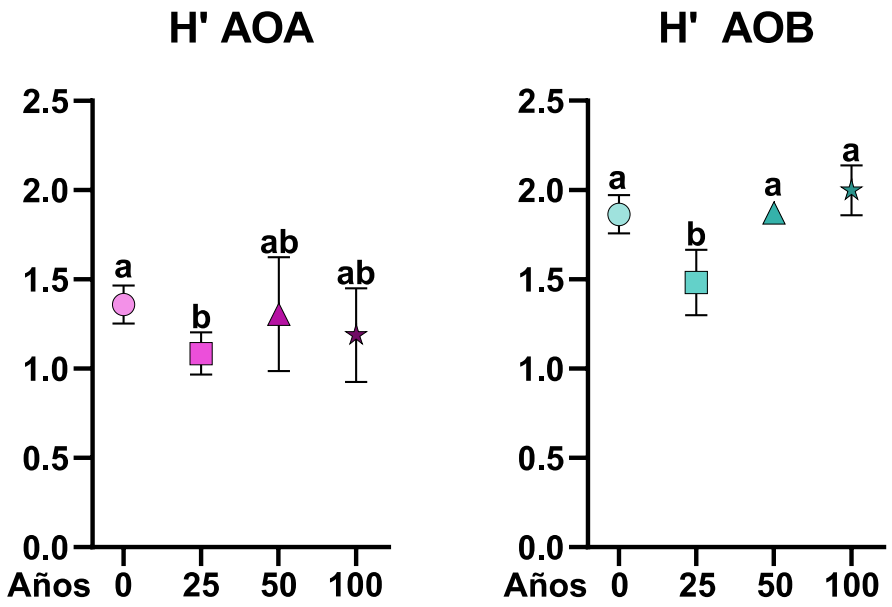

Figura 8. Índices de diversidad de Shannon de los oxidadores de amonio con base al gen marcador *amoA* para AOA (izquierda) y AOB (derecha). Letras diferentes expresan diferencias significativas ($p<0.05$) de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis.

Primeramente, mediante un análisis de PERMANOVA se observó que existen diferencias significativas en la estructura de las comunidades oxidadoras de amonio de los suelos regados con agua residual con los de temporal (diversidad beta). Sobre todo, se ve reflejado en la presencia y ausencia de AOA, y en menor proporción de AOB. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los suelos cuando se tomó en cuenta la abundancia de estos grupos (**Tabla 7**).

Tabla 7. Valores *p* del análisis de PERMANOVA comparando los suelos regados con agua residual vs los suelos de temporal (ST). Análisis de β-diversidad (999 permutaciones).

AOA		AOB	
unifrac		*unifrac*	
	Suelos irrigados con WW		Suelos irrigados con WW
ST	0.020*	ST	0.075
Pr(>F)=	0.018	Pr(>F)=	0.074
wunifrac		*wunifrac*	
	Suelos irrigados con WW		Suelos irrigados con WW
ST	0.260	ST	0.089
Pr(>F)=	0.310	Pr(>F)=	0.071

* *p*-value < 0.05. Unifrac=algoritmo de distancia de Unifrac no ponderado, wunifrac: algoritmo de distancia de Unifrac ponderado.

En general, la estructura de la comunidad de las AOA y AOB se vio afectada por el uso del agua residual (**Fig. 9**). Para el caso de la comunidad arqueana oxidadora de amonio, ésta formó dos agrupaciones separadas por un 88% de variación que corresponden a los suelos de temporal (0 años) y aquellos que han sido regados con agua residual (25, 50 y 100 años) (**Fig. 9a**). Aunque no existen diferencias significativas en la estructura de la comunidad entre los suelos irrigados. Para la comunidad bacteriana se mantiene el agrupamiento de las muestras en 2 conjuntos separados por un 56.8% de variación. Sin embargo, el agrupamiento de los suelos irrigados es menos compacto en comparación con el de AOA, sobre todo por la ligera separación de las muestras correspondientes a 100 años de riego (**Fig. 9b**).

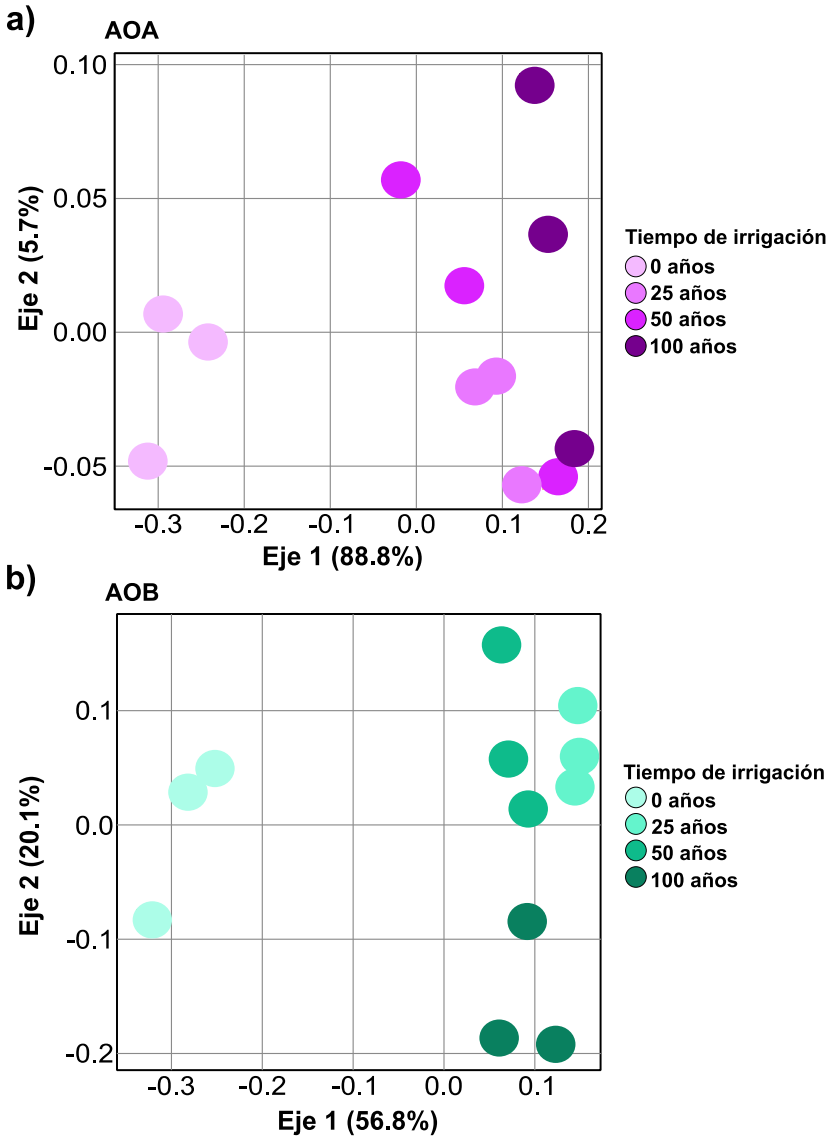

Figura 9. Análisis de componentes principales de la matriz de distancia Unifrac ponderada (PCoA-Wunifrac) de secuencias *amoA* de: a) AOA, y b) AOB.

9.1.4 Aproximación taxonómica de los genes *amoA*

Los OTUs previamente establecidos de AOA y AOB fueron afiliados a grupos taxonómicos previamente establecidos en la literatura a través de árboles filogenéticos (**Figs. 10 y 11**). Los 22 OTUs de AOA fueron afiliados a dos grandes grupos, uno para el género *Nitrososphaera* y otro para *Nitrosocosmicus*, ambos pertenecientes al phylum Crenarchaeota. El grupo mayoritario fue el asociado a *Nitrososphaera*, y agrupó 19 OTUs repartidos en cuatro subgrupos. El primer subgrupo contuvo 5 OTUs y estuvo relacionado con secuencias provenientes de aislados ambientales presentes en sitios como humedales o suelos costeros alcalinos. El segundo subgrupo de igual manera estuvo relacionado a

cepas no cultivables de ambientes edáficos con manejo agrícola como arrozales y contenía 6 OTUs. El subgrupo III engloba 7 OTUs, que tiene una relación cercana con especies conocidas de *Nitrososphaera* como *N. viennensis*, *N. gargensis* y *N. evergladensis*. El último subgrupo sólo contiene un OTU y se encuentra cercanamente relacionado a un aislado ambiental. El grupo de *Nitrosocosmicus* contiene 3 OTUs en un solo subgrupo, que a su vez se correlaciona con especies como *N. franklandus, N. hydrocola* y *N. oleophilus* (**Fig. 10**).

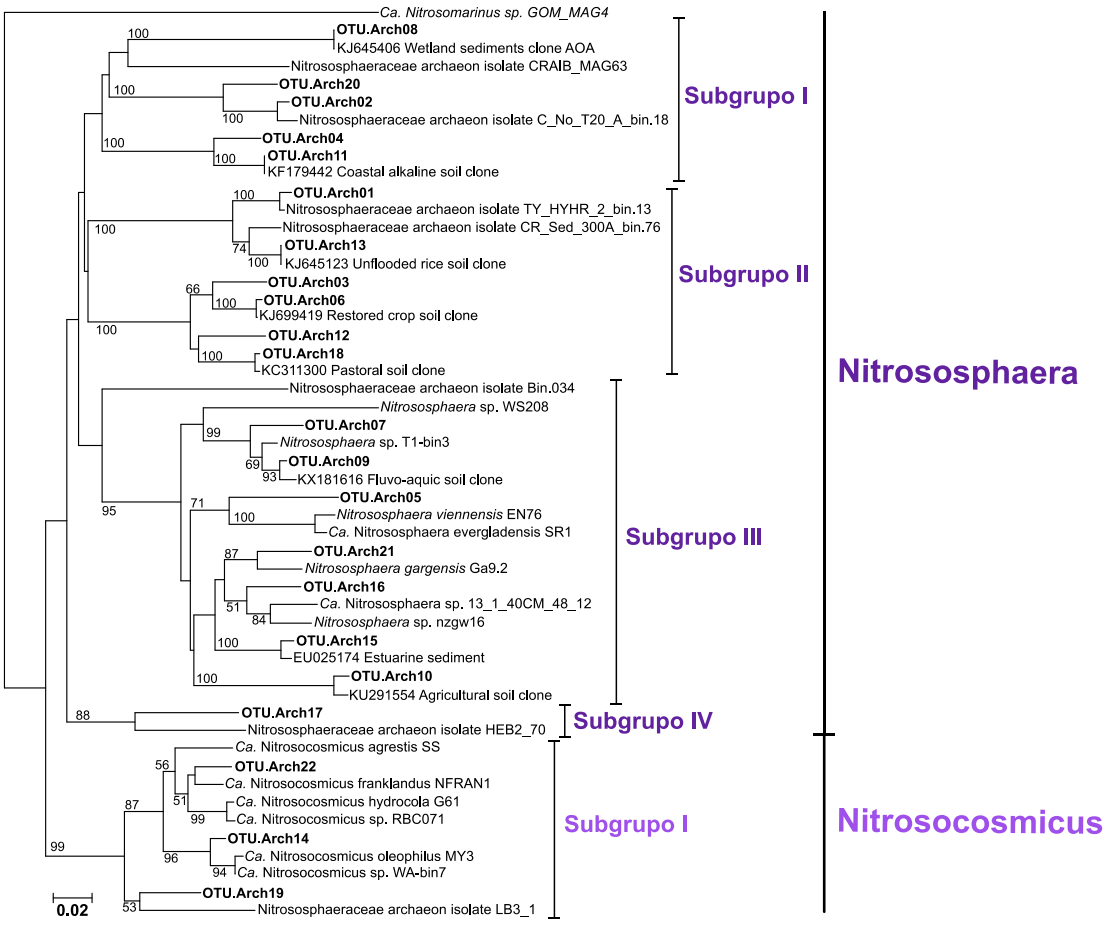

Figura 10. Árbol filogenético construido con secuencias *amoA* de AOA bajo el método Neighbor Joining usando el modelo de Kimura 2-P (K2P) como modelo de distancia. Bootstrap ≥ 50% (1000 réplicas).

Por otro lado, los 30 OTUs de AOB fueron asociados en 2 grupos, uno para *Nitrosospira* y el otro para *Nitrosomonas*. El grupo de *Nitrosomonas* solo contiene un subgrupo, y a su vez solo contiene un OTU que es cercano a *N. stercoris*. El grupo Nitrosospira fue dominante al contener 29 OTUs repartidos en cuatro subagrupaciones (**Fig. 11**) con base en su cercanía filogenética. El primer subgrupo contiene un OTU y está relacionado con *Nitrosospira* sp. NpAV. El subgrupo II es el más grande ya que agrupó a 17 OTUs, y a su vez albergó secuencias relacionadas a *N. multiformis, Nitrosovibrio* sp. Nv4 y otros aislados

de ambientes terrestres. El subgrupo III fue el segundo más grande al contener ocho OTUs, asociados fuertemente con secuencias de aislados de suelos agrícolas. El último subgrupo contenía secuencias relacionadas a especies definidas como *N. tenuis* y *N. briensis*, sin embargo, dos de sus tres OTUs estaban más cercanas a especies con caracterización incompleta como *Nitrosospira* sp. 56-18 y *Nitrosospira* sp. SCN18.

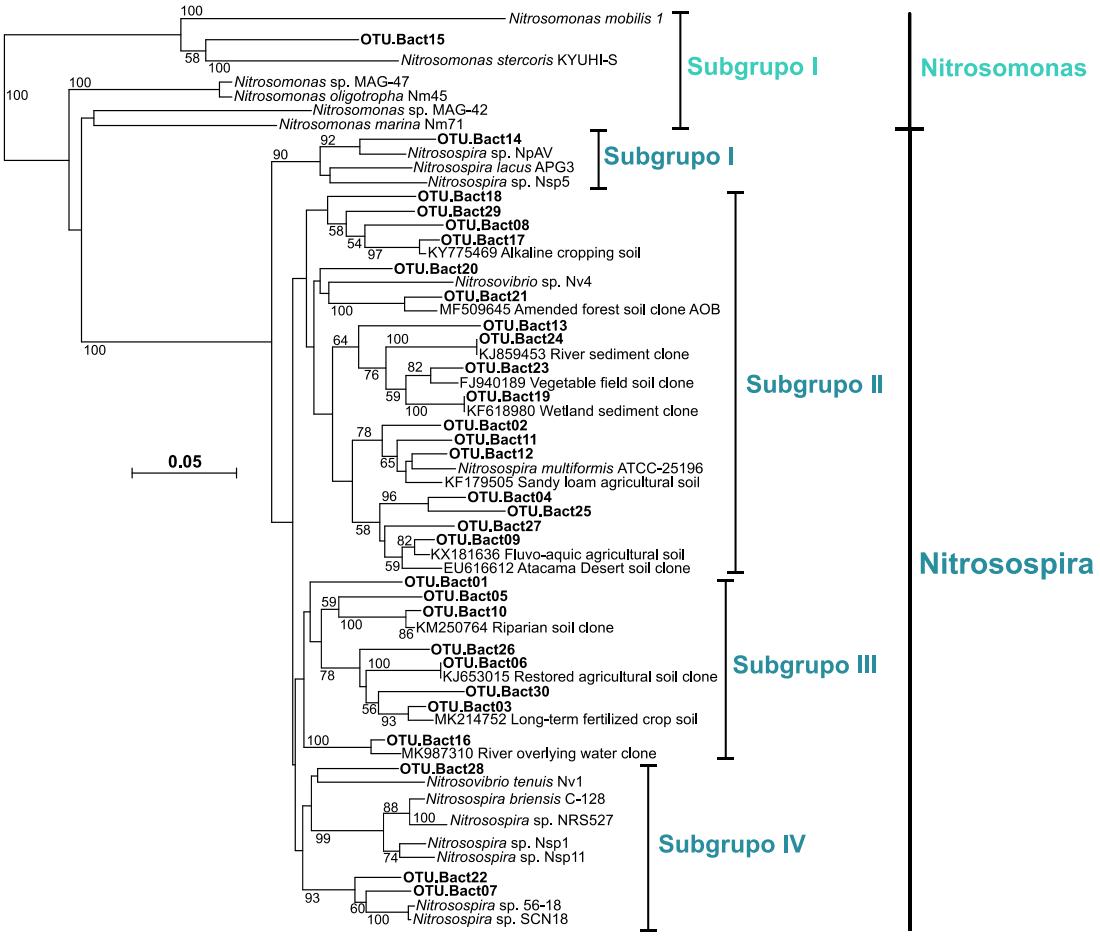

Figura 11. Árbol filogenético construido con secuencias *amoA* de AOB bajo el método Neighbor Joining usando Kimura 2-P (K2P) como modelo de distancia. Bootstrap ≥ 50% (1000 réplicas).

9.1.5 Abundancias relativas de los grupos taxonómicos identificados

A partir de la afiliación taxonómica previamente realizada mediante los árboles, se llevó a cabo una aproximación cuantitativa mediante el cálculo de las abundancias relativas en los niveles de subgrupos y filotipo (**Fig. 12**). Para las AOA, el subgrupo II de *Nitrososphaera* fue el más abundante en todos los suelos estudiados, teniendo un crecimiento gradual conforme se acumulaban los riegos, yendo de poco más de 50% en suelos de 0 años, hasta más del 70% en los suelos regados por 100 años (**Fig. 12a**). El subgrupo I fue el siguiente con mayor abundancia, aunque esta decreció más de la mitad conforme el paso del tiempo

bajo riego. Los subgrupos III y IV fueron los menos abundantes de *Nitrososphaera*, aunque el subgrupo IV solo fue detectado en las muestras de 50 y 100 años. El subgrupo relacionado a *Nitrosocosmicus* solo fue encontrado en muestras de suelos irrigados con agua residual, aunque nunca superó el 0.4% (**Fig. 12b**). En el caso de las AOB (**Fig. 12b**), los subgrupos II y III de Nitrosospira fueron los dominantes en todos los suelos compartiendo una abundancia similar. Esta abundancia de Nitrosospira ronda entre los 40 y 55%, en los 4 tiempos de irrigación estudiados, sin embargo, no hubo tendencias en cuanto a cambios en su fluctuación. El subcluster I de *Nitrosospira* y de *Nitrosomonas* solo tuvieron representantes en suelos irrigados con agua residual. En el caso del subgrupo I de Nitrosospira el pico fue apenas superior al 1% a los 50 años de riego, mientras que, el de *Nitrosomonas* fue a los 25 años, pero ninguno superó el 1%. Finalmente, el subgrupo IV de Nitrosospira estuvo presente en todos los tiempos estudiados, aunque éste fue más abundante a los 100 años, teniendo >15% de abundancia relativa (**Fig. 12b**).

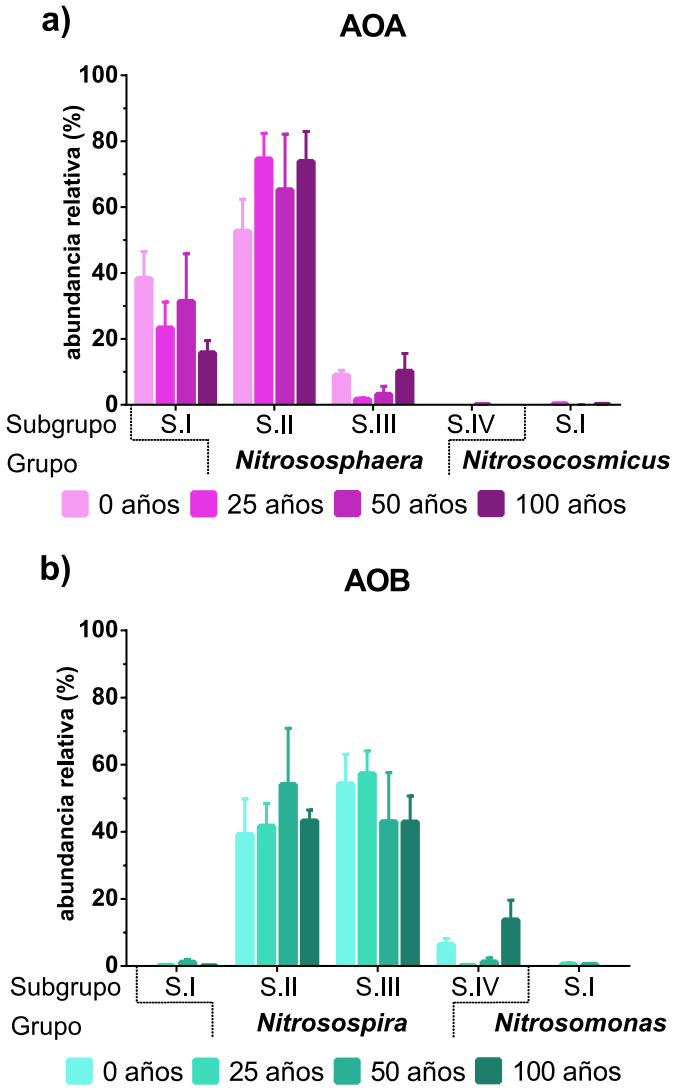

Figura 12. Abundancia relativa de los taxones identificados por secuencias *amoA* mediante los árboles filogenéticos previos en suelos con diferente número de años bajo riego con agua residual. a) AOA, b) AOB.

La abundancia de los filotipos también fue calculada basada en el número de secuencias encontradas por parcela. En general se observó que la abundancia de los filotipos varía en mayor medida en comparación que con categorías taxonómicas superiores. Para el caso de las AOA se observó que el OTU.Arch1 incrementó su abundancia más de ocho veces posterior al riego, siendo el OTU dominante en los suelos irrigados con agua residual. Por el contrario, la abundancia promedio del OTU.Arch2 disminuye de forma gradual posterior al riego de 36% en suelos de temporal hasta 8% en suelos regados por 100 años. El OTU.Arch3 fue el filotipo dominante en los suelos de temporal, y a diferencia del OTU.Arch2, su abundancia promedio se desploma de 43% hasta el 6 -7% en suelos irrigados de forma uniforme. Además, el uso de agua residual tuvo un gran efecto sobre algunos filotipos como el OTU.Arch9 y el OTU.Arch15, ya que éstos no fueron detectados (**Fig. 13**).

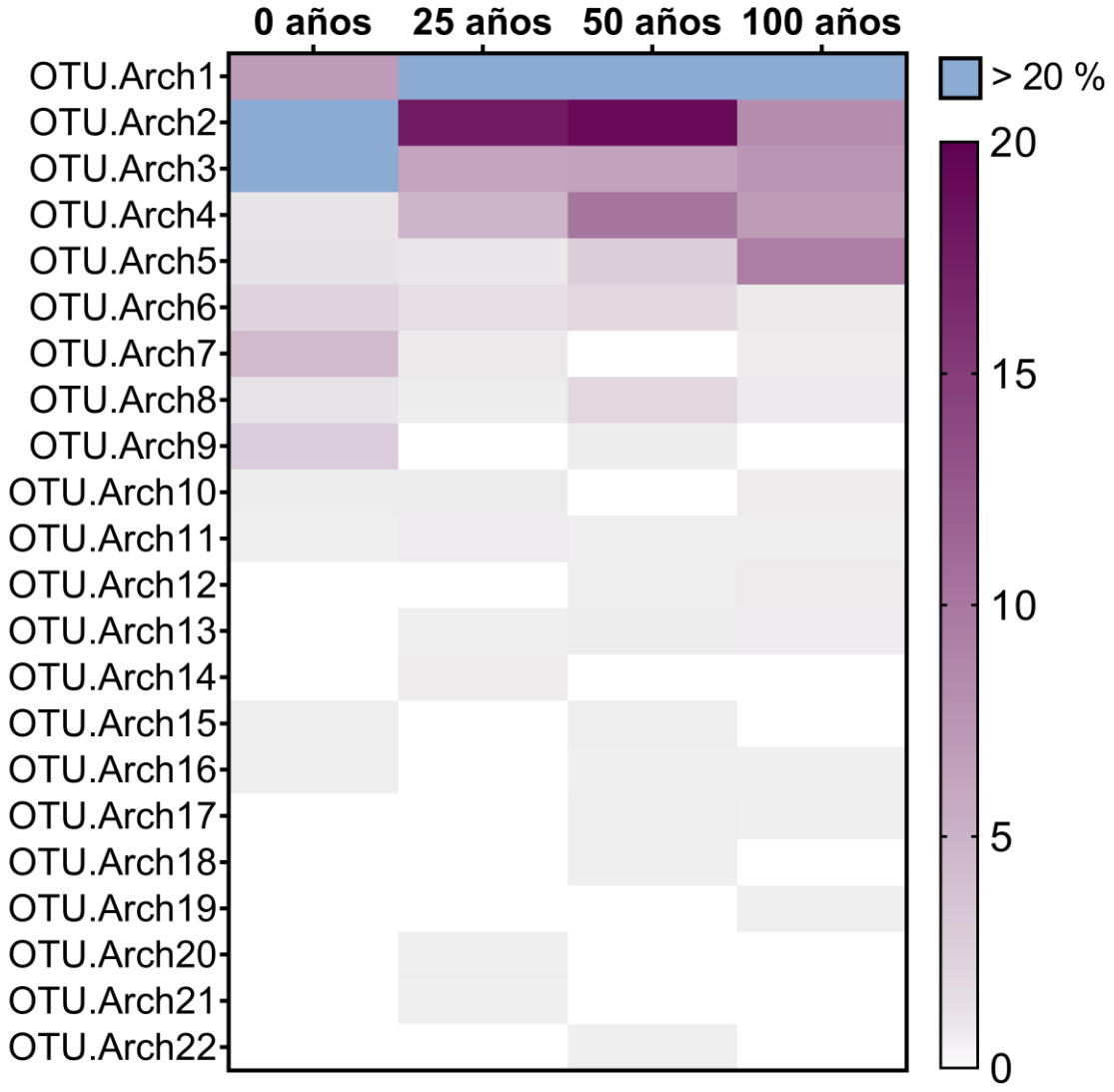

Figura 13. Abundancia relativa de los filotipos asociados a AOA. La barra lateral representa la escala de colores en relación con el valor asignado. Los valores azules representan valores por encima del 20%.

En particular para las AOB, el OTU.Bact1 era un grupo minoritario en suelos de temporal, sin embargo, con la entrada de agua residual su abundancia promedio se elevó hasta 48% en los suelos regados por 25, posteriormente se estabilizó disminuyendo su abundancia entre 26 – 29% hacia los 50 y 100 años de riego. El OTU.Bact2 por su parte fue el más abundante en los suelos de temporal, y permaneció como uno de los más abundantes en los 25 y 50 años, sin embargo, su abundancia decrece en los 100 años a poco menos de la mitad. OTU.Bact3, OTU.Bact5 y OTU.Bact6 también decrecieron posterior al riego con agua residual, aunque en diferente magnitud. OTU.Bact3 representaba el 23% de la abundancia de AOA en suelos de temporal decreció, y posteriormente se estabilizó hacia los siguientes años, mientras que, OTU.Bact5 y OTU.Bact6 ya no fueron detectados en los suelos con mayor cantidad de años regados con agua residual. En el caso contrario, OTU.Bact9 y OTU.Bact11 pasaron de abundancias relativas cercanas o iguales a 0% a 13% y casi 5%, respectivamente. Cabe resaltar que tanto para AOA y AOB de los suelos regados con agua residual tuvieron la presencia de una mayor cantidad de filotipos, aunque con abundancias relativas menores al 3% (**Fig. 14**).

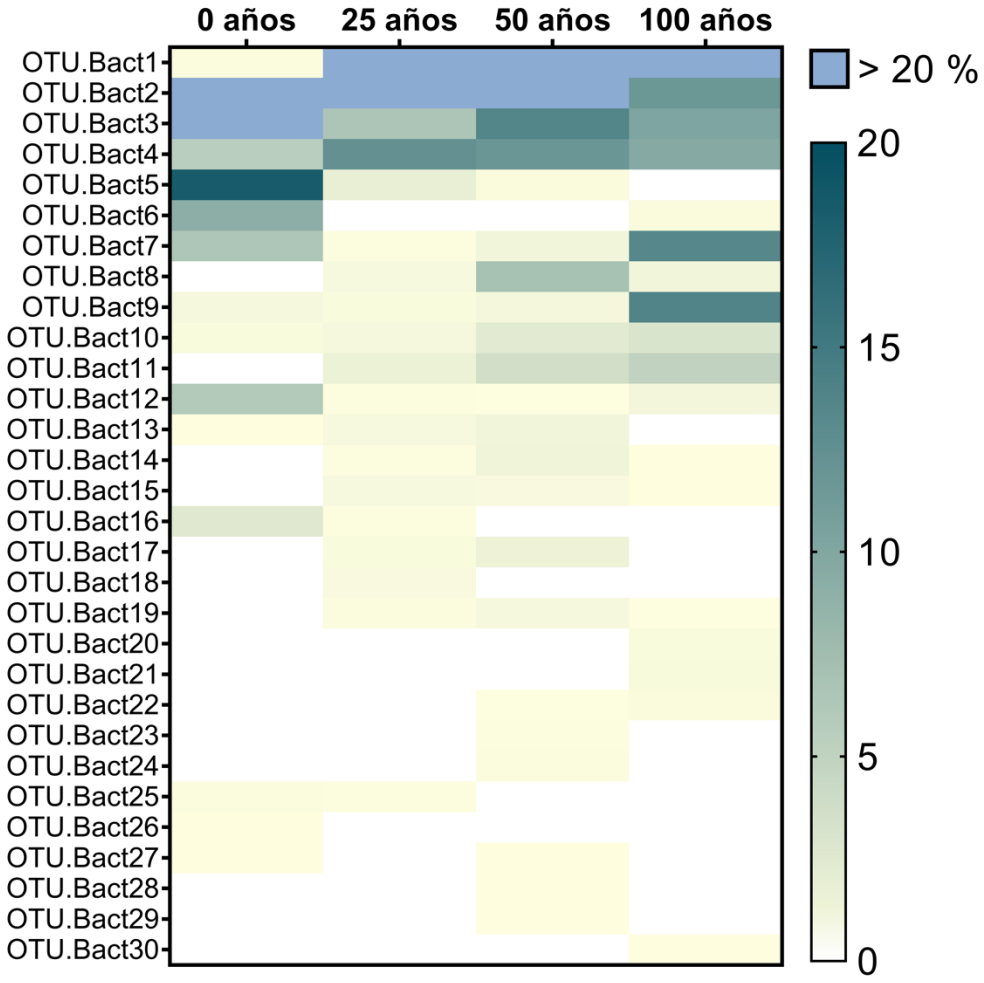

Figura 14. Abundancia relativa de los filotipos asociados a AOB. La barra lateral representa la escala de colores en relación con el valor asignado. Los valores azules representan valores por encima del 20%.

9.1.6 Correlación del componente microbiológico con las características fisicoquímicas del suelo

Para asociar los cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo con los atributos de la comunidad oxidadora de amonio propia de cada suelo evaluado, se llevó a cabo un análisis de correlación. En él se pudo observar que no hay una correlación significativa entre la diversidad de AOA y AOB con ninguno de los parámetros registrados. En el caso de la abundancia de los genes *amoA*, se pudo notar un patrón, en el que las AOA tienen una correlación positiva fuerte con el carbono, ya sea el total o el orgánico. Mientras que, la abundancia del gen *amoA* de AOB tuvo una correlación significativa con pH, Nt e IT. Posteriormente fueron evaluadas las abundancias relativas de cada uno de los grupos con relación a los mismos parámetros fisicoquímicos. Para las AOA, solo el subgrupo IV de *Nitrososphaera* se correlacionó significativamente con las fuentes de carbono. Mientras que, para las AOB, los subgrupos I y II de Nitrosospira se correlacionaron con CE y fuentes de C, respectivamente. Cabe mencionar que los otros grupos no tuvieron correlaciones significativas, sin embargo, se pudieron observar tendencias en cuanto a los índices de correlación. Como el caso del subgrupo I de *Nitrososphaera* y el III de Nitrosospira, que tuvieron una correlación débil y negativa con pH, CE, NT e IT. Caso contrario, con el grupo de *Nitrosocosmicus* y *Nitrosomonas*, el subgrupo II de *Nitrososphaera* y el II de Nitrosospira cuyas correlaciones se asocian de forma positiva con pH, CE, Nt y el IT (**Fig. 15**).

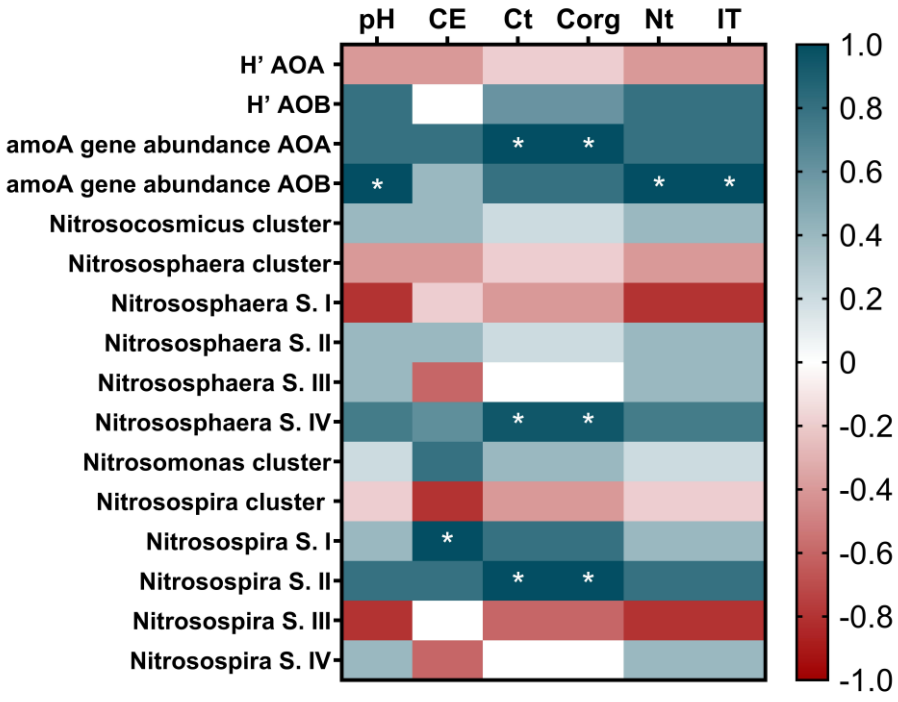

Figura 15. Mapa de calor con la correlación de Spearman entre las características de las comunidades amonio oxidadoras en una cronosecuencia de riego y las variables edáficas fisicoquímicas del suelo. * = $p<0.05$

9.2 Diversidad génica de los genes involucrados en la oxidación de amonio en una cronosecuencia de suelos regados con agua residual usando herramientas metagenómicas

9.2.1 Detección de probables oxidadores de amonio

Los metagenomas fueron procesados para retirar secuencias de mala calidad y los extremos correspondientes a los adaptadores. A partir de ello, las lecturas fueron sometidas a un análisis de afiliación taxonómica a través de Kaiju, por el que cada lectura era asignada a algún grupo taxonómico con relación a bases de datos del NCBI. A partir de las listas generales se realizó un filtro para buscar grupos relacionados con la oxidación de amonio.

En relación con las AOA, la abundancia relativa de los suelos de temporal (~ 0.35%) fue menor a la de los suelos irrigados con agua residual (~ 0.45 – 0.6%), siendo los suelos regados con agua residual los que presentaron la mayor abundancia. Fueron detectados diez géneros diferentes, así como un grupo con secuencias de cepas no cultivables. En general, se observó que la abundancia de *Nitrosocomicus* se incrementa con el riego con agua residual, así como las agrupadas como no cultivables. *Nitrososphaera* demostró ser mayoritaria en los suelos de temporal, y sufre una ligera disminución en los suelos irrigados donde se mantiene constante. Otros géneros como *Nitrosopolaris* también fueron detectados de forma constante (~ 0.05%). Mientras que las lecturas asociadas con otros géneros como *Nitrosopelagicus*, *Nitrosotalea*, entre otros, tuvieron un aporte mínimo (<0.01% cada una) (**Fig. 16**).

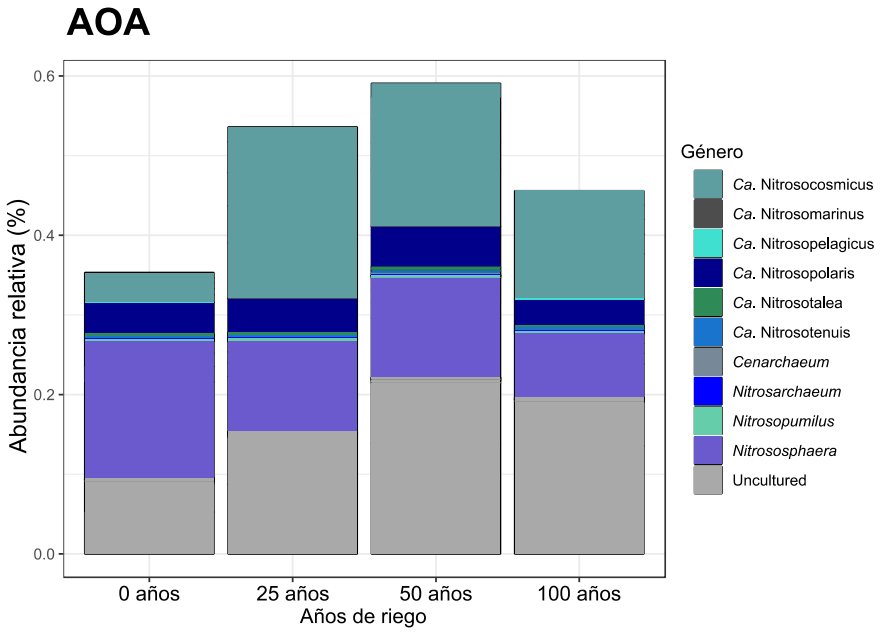

Figura 16. Abundancia relativa de probables grupos arqueanos oxidadores de amonio detectados en los metagenomas de la cronosecuencia.

Para las AOB fueron detectadas lecturas asociadas a seis géneros conocidos y uno no cultivable. En este caso la abundancia de éstas solo aumenta en los suelos irrigados por

25 y 50 años (~ 0.23 – 2.8%), mientras que, las muestras de temporal y de 100 años de irrigación se mantienen similares (~ 0.2%). En todas las muestras *Nitrosospira* fue el género mayoritario llegando a ocupar hasta 0.15%, seguido por *Nitrosomonas* (~ 0.1%). Sin embargo, fue posible detectar secuencias relacionadas con *Nitrosococcus* y *Nitrosovibrio* en todas las muestras (~ 0.01 – 0.02% cada una). También fueron detectados grupos como *Nitrosacidococcus* y *Nitrosoglobus,* aunque en menor grado en comparación con los otros grupos (**Fig. 17a**).

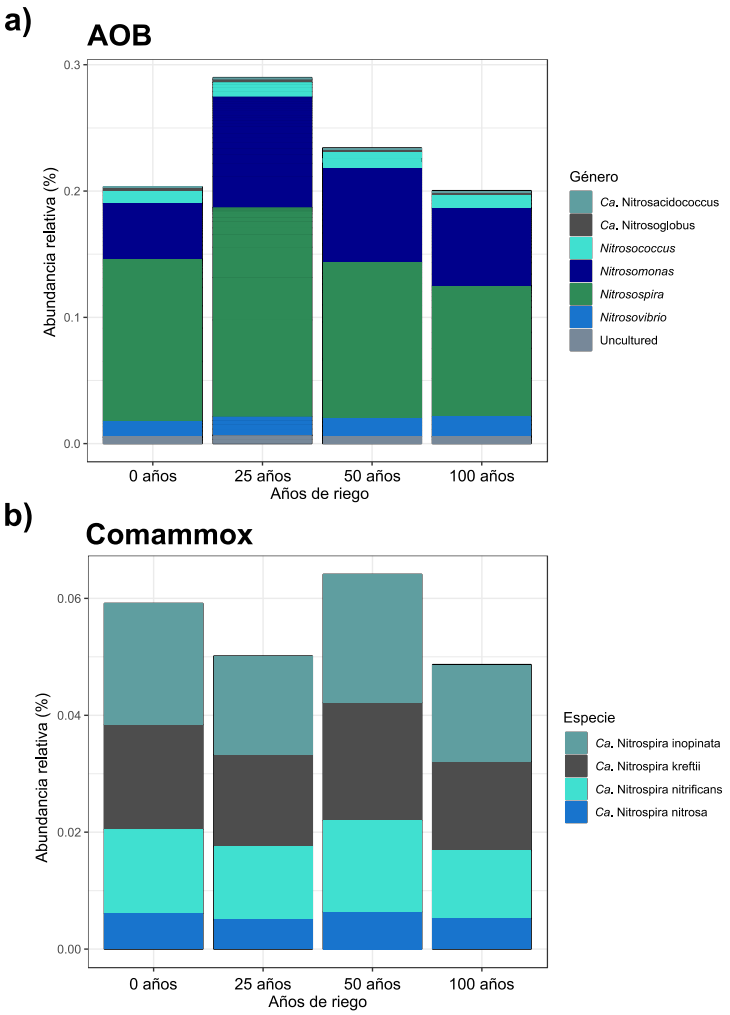

Figura 17. Abundancia relativa de probables grupos bacterianos oxidadores de amonio. a) AOB y, b) Comammox, detectadas en las secuencias de los metagenomas de la cronosecuencia.

Finalmente, fue posible detectar cuatro especies correlacionadas con comammox en todos los sitios estudiados. Su abundancia relativa no varía entre los suelos de temporal y los irrigados por 25 y 50 años, aunque para los 100 años de irrigación ésta disminuye de ~ 0.06% hasta 0.05%. Las especies encontradas en orden decreciente conforme a su abundancia relativa fueron *Ca*. Nitrospira inopinata, *Ca*. Nitrospira kreftii, *Ca*. Nitrospira nitrificans y *Ca*. Nitrospira nitrosa (**Fig. 17b**).

9.2.2 Identificación de especies oxidadoras de amonio a través del gen *amoA*

Se realizó la búsqueda de genes *amoA* en las lecturas de los metagenomas con su respectiva pertenencia taxonómica para evaluar la presencia y frecuencia de grupos asociados a la oxidación de amonio. A partir de ello fueron identificadas secuencias de *amoA* relacionadas a 24 diferentes especies o aislados (en el caso de los no cultivables). En ellas, se evaluó la presencia o ausencia de éstas en las diferentes muestras estudiadas (**Fig. 18**). En los suelos de temporal fueron detectadas secuencias de *amoA* arqueanas de 12 diferentes especies, donde 5 de ellas corresponden al género *Nitrosophaera*, que es el predominante. Para los suelos de 25 años fueron detectadas secuencias del gen *amoA* de 19 especies diferentes. Las especies encontradas en los suelos de 25 años fueron agrupadas en su mayoría en el género *Nitrosocosmicus* (6 especies) y a aislados ambientales (6 especies), mientras que, *Nitrososphaera* se mantuvo con 5 especies. Para los suelos con 50 años de riego, fueron detectadas secuencias *amoA* correspondientes a 22 especies diferentes, donde *Nitrosocosmicus* y los aislados ambientales se mantienen como los géneros con mayor número de especies encontradas con 7 cada uno, mientras que, *Nitrosopolaris* aumentó el número de especies asociadas con 4. Finalmente, en los suelos regados por 100 años se detectaron 21 secuencias diferentes repartidas en las mismos 4 agrupaciones, siendo los aislados ambientales y *Nitrosocosmicus*, los taxones con mayor riqueza.

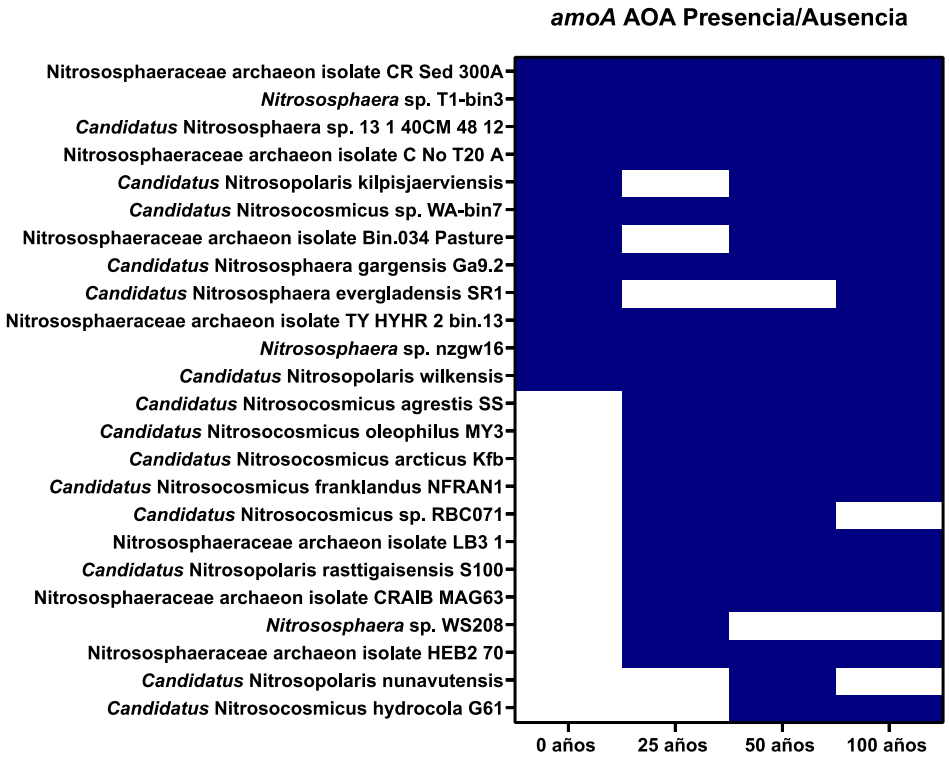

Figura 18. Diagrama de presencia/ausencia de especies de AOA con base en su detección mediante el gen *amoA* en metagenomas. Recuadro azul = presencia, recuadro blanco = ausencia.

Con base en el análisis anterior, se determinó que el núcleo de oxidadoras de amonio arqueanas está conformado por nueve especies diferentes, de las cuales cuatro pertenecen al género *Nitrososphaera*, tres son aislados ambientales, una es *Nitrosopolaris* y otra de *Nitrosocosmicus*. Mientras que, la coocurrencia de ocho especies entre los suelos regados más conforma un nuevo núcleo secundario que agrupa a los suelos irrigados con agua residual conformado por: cuatro AOA del género *Nitrosocosmicus*, tres aislados y una secuencia de *Nitrosopolaris*. Cabe mencionar que los suelos de temporal no tienen representantes únicos, pero si llegan a compartir especies con otros tiempos de riego: una con los suelos de irrigados por 100 años y 2 con los suelos irrigados con 50 y 100 años (**Fig. 19**).

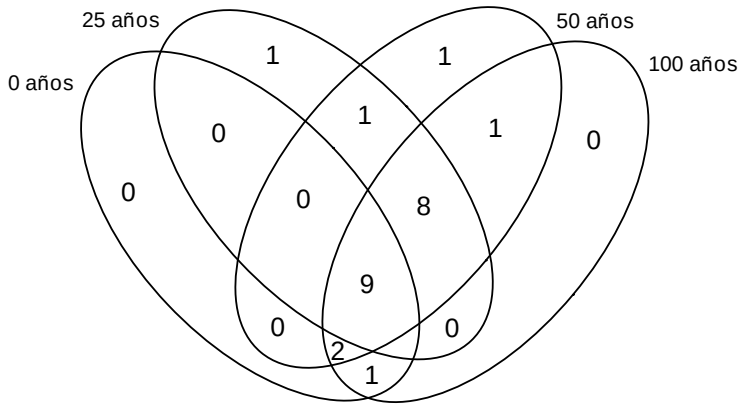

Figura 19. Diagrama de Venn de co-ocurrencia de especies AOA en las muestras de suelos detectadas por metagenomas.

A la par se detectaron 16 especies de AOB con base en la identificación mediante el gen *amoA*. Los suelos de temporal tuvieron una riqueza de ocho especies, en su mayoría representada por el género *Nitrosospira* (7 especies) y *Nitrosovibrio* (1 especie) (**Fig. 20**). Posteriormente, hacia los 25 años de riego con agua residual la riqueza encontró su pico más alto al detectar 12 especies diferentes en 4 géneros, siendo *Nitrosospira* el género con mayor riqueza con 5 especies. Particularmente, fue posible detectar los géneros *Nitrosomonas* (4 especies) y *Nitrospira* comammox (1 especie). Los suelos de 50 años también mantuvieron una riqueza de 10 especies de 3 géneros: *Nitrosospira, Nitrosovibrio* y *Nitrosomonas*. Finalmente, en los suelos irrigados por 100 años, al igual que los de temporal solo fueron detectados dos géneros: *Nitrosospira* (6 especies) y *Nitrosovibrio* (2 especies).

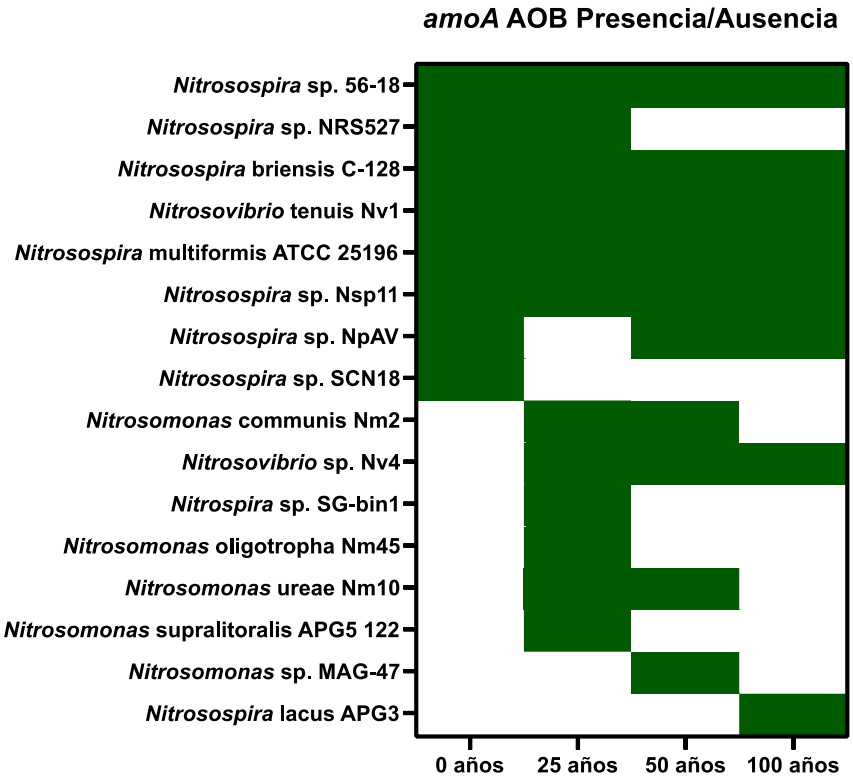

Figura 20. Diagrama de presencia/ausencia de especies de AOA con base en su detección mediante el gen *amoA* en metagenomas. Recuadro verde = presencia, recuadro blanco = ausencia.

El núcleo o *core* (especies compartidas) de AOB de los suelos estudiados mediante la presente metodología estuvo integrado por 5 especies, en su mayoría del género *Nitrosospira* (4 especies) y solo con un representante de *Nitrosovibrio* (**Fig. 21**). Caso contrario a lo ocurrido con las AOA, en los todos los suelos estudiados hubo por lo menos una especie representativa siendo una *Nitrosospira* para los casos del suelo de temporal y el irrigado por 100 años, mientras que en los de 25 y 50 años se incluyeron *Nitrosomonas* y *Nitrospira* para el caso particular de los suelos irrigados por 25 años.

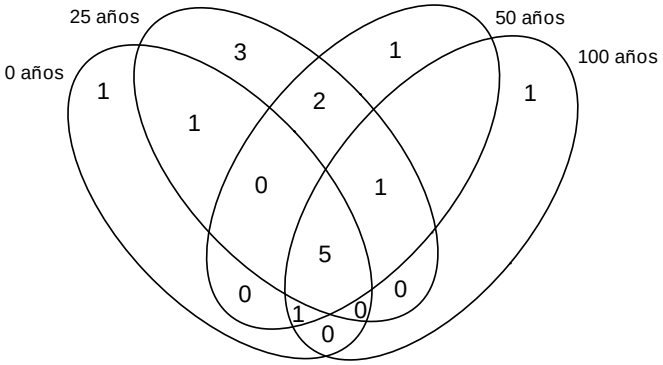

Figura 21. Diagrama de Venn de co-ocurrencia de especies AOB en las muestras de suelos con agua residual y detectados en los metagenomas.

9.2.3 Abundancia de genes *amoA* relacionados a AOA, AOB y Comammox

La búsqueda del gen *amoA* de AOA encontró 67 coincidencias en la muestra de suelos de temporal, 94 coincidencias en los suelos de 25 años de riego. Mientras que los suelos regados por 50 y 100 años fueron los que tuvieron un mayor número de coincidencias con 105 y 109, respectivamente. Estas coincidencias de los genes *amoA* a su vez se afiliaron a tres géneros de AOA conocidos (*Nitrosocosmicus, Nitrosopolaris* y *Nitrosphaera*) y uno que corresponde a cepas ambientales no cultivables. Con base en la frecuencia de éstos, se calculó la abundancia relativa del gen, y se observó que las secuencias *amoA* de *Nitrososphaera* fueron las más abundantes en los suelos de temporal al ser casi el 70% de las secuencias detectadas (**Fig. 22**). El otro 30% se repartió entre cepas no cultivables, *Nitrosocosmicus* y *Nitrosopolaris* (en orden decreciente de abundancia). En los suelos regados con agua residual se incrementó por otra parte el gen *amoA* relacionado con cepas oxidadoras de amonio no cultivables, llegando a representar las del 50% en el caso de los suelos regados por 100 años. La abundancia de *Nitrosocosmicus* también aumentó con la irrigación, pasando de menos del 5% en suelos de temporal, hasta alrededor de 25%. Las secuencias de *amoA* de *Nitrosopolaris* continuaron siendo las menos representadas teniendo su pico en los suelos de 100 años superando el 10%.

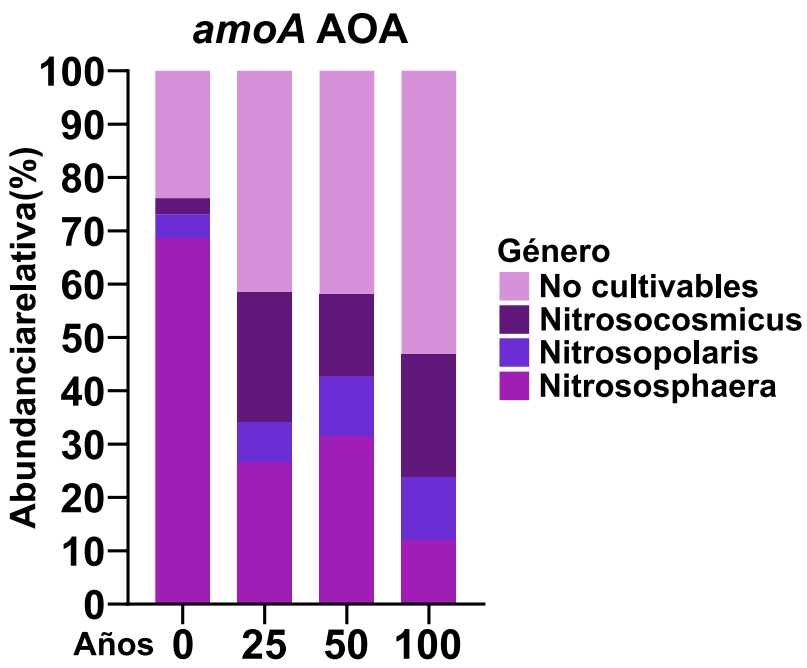

Figura 22. Abundancia relativa del gen *amoA* de AOA detectada en los metagenomas.

En general, para el gen *amoA* de AOB se encontraron menos coincidencias en comparación con el de AOA. Para los suelos de temporal se encontraron 37 coincidencias del gen, mientras que, los suelos de 25 años fueron los que tuvieron un mayor número de coincidencias con 58 para AOB (**Fig. 23**). Para los suelos de 50 y 100 años el número de coincidencias disminuyó en comparación con el suelo de temporal, habiendo encontrado 36 y 27 coincidencias de forma correspondiente. Estas coincidencias a su vez fueron agrupadas de acuerdo con el género al que pertenecen, siendo estos cuatro: *Nitrosospira, Nitrosovibrio, Nitrosomonas* y *Nitrospira*, donde el último corresponde a organismos comammox. En todos los suelos estudiados, el gen *amoA* de *Nitrosospira* fue el predominante llegando a ser hasta el 80% de las secuencias en suelos de temporal y regados por 100 años, mientras que, en los de 25 y 50 años solo representaba alrededor del 50% de las secuencias *amoA* de AOB. Además, las secuencias *amoA* asociadas a *Nitrosovibrio* también estuvieron presentes en todos los sitios muestreados, representando entre 17% hasta casi 28% en los suelos irrigados por 50 años. En los suelos irrigados por 25 y 50 años a su vez, fueron detectadas secuencias relacionadas con *Nitrosomonas*, siendo inclusive las segundas más dominantes ya que poseían entre el 22 – 27% de los genes *amoA* detectados. Finalmente, solo fue posible detectar secuencias asociadas a *Nitrospira* en los suelos de 25 años de riego (> 3%).

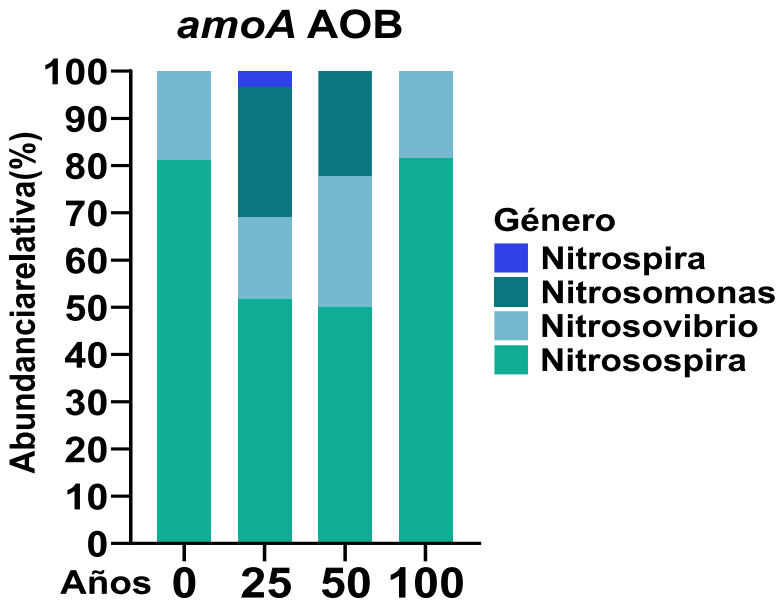

Figura 23. Abundancia relativa del gen *amoA* de AOB detectada en los metagenomas.

9.2.4 Comparación entre los filotipos obtenidos por secuenciación de amplicones y metagenómica

Se obtuvieron secuencias correspondientes a los genes *amoA* de AOA y AOB de los ensamblajes metagenómicos de los suelos. Estas se usaron para compararlas con las secuencias obtenidas previamente en la secuenciación de amplicones mediante un árbol filogenético.

En las AOA se recuperaron 15 secuencias completas y parciales del gen *amoA* entre los diferentes ensamblajes. Al analizarse a la par que las secuencias obtenidas previamente se conformaron 5 grupos: 3 relacionados a aislados ambientales de la familia Nitrososphaeraceae, 1 para el género *Nitrososphaera* y otro más para *Nitrosocosmicus*. El primer grupo de aislados ambientales contiene solo una secuencia asociada a clonas de sedimentos (**Fig. 24**). El segundo grupo ambiental integra cinco filotipos provenientes de los metagenomas. En este se destaca que, en general, éstos están presentes en todos los tiempos de riego, en comparación con algunos OTUs previos donde presentan ausencias en los suelos de temporal. El tercer grupo ambiental integra cinco filotipos metagenómicos justo con dos OTUs previos, teniendo presencia en todos los tiempos de riego. El grupo de *Nitrososphaera* es más heterogéneo ya que presenta una mezcla entre OTUs de la secuenciación de amplicones y metagenómicos, sin un patrón de presencia o ausencia en

los diferentes suelos. Finalmente, el grupo de *Nitrosocosmicus* está ausente en los suelos de temporal, siendo confirmado por los filotipos de los dos diferentes tipos de estrategias.

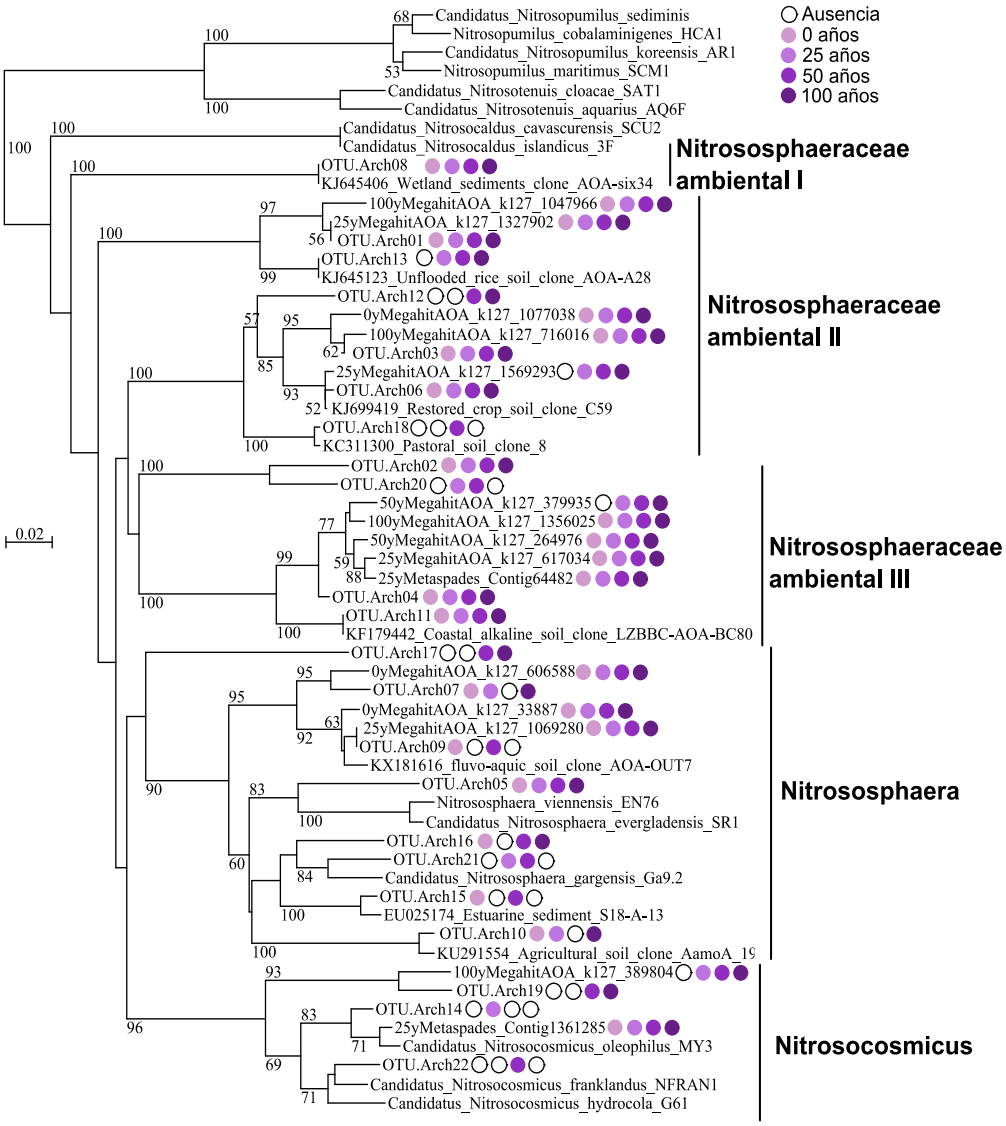

Figura 24. Árbol filogenético construido con secuencias *amoA* de AOA provenientes de la secuenciación de amplicones y de los metagenomas bajo el método Neighbor Joining usando Kimura 2-P (K2P) como modelo de distancia. Bootstrap ≥ 50% (1000 réplicas).

Posteriormente, para las AOB se encontraron secuencias de igual manera parciales y completas correspondientes a 2 géneros y una familia: *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*, y Nitrosomonadaceae (**Fig. 25**). *Nitrosomonas* contiene un OTU proveniente de la secuenciación de amplicones, sin embargo, se añadió 1 filotipo más proveniente de los metagenomas. Ambos filotipos solo fueron detectados en suelos irrigados. *Nitrosospira* se pudo subdividir en 3 subgrupos. El primer grupo solo contiene una secuencia proveniente de la secuenciación de amplicones y está relacionado a *Nitrosospira lacus*. El segundo subgrupo agrupa secuencias provenientes de aislados ambientales con exclusivamente

OTUs provenientes de la secuenciación de amplicones. En ellos se puede distinguir que una parte cercana a suelos agrícolas fluvoacuáticos suele estar presente en los primeros tiempos evaluados (0 y 25 años), mientras que, la parte más cerca de humedales y suelos forestales está ausente en suelos de temporal y empieza a ser detectada en ellos suelos irrigados. Finalmente, el tercer subgrupo se caracteriza por tener una relación fuerte con *Nitrosospira briensis* y algunos aislados ambientales. En él se incluyeron dos filotipos provenientes de los metagenomas: uno que solo fue identificado en los tiempos 0 y 25 de irrigación, y que es cercano a OTUs.Bact05 y OTUs.Bact10; mientras que, el otro más cercano a *N. briensis* estuvo presente en todos los suelos evaluados. Finalmente, se formó un último grupo perteneciente a secuencias no definidas de la familia Nitrosomonadaceae con secuencias exclusivamente metagenómicas que fueron encontradas en todos los suelos evaluados.

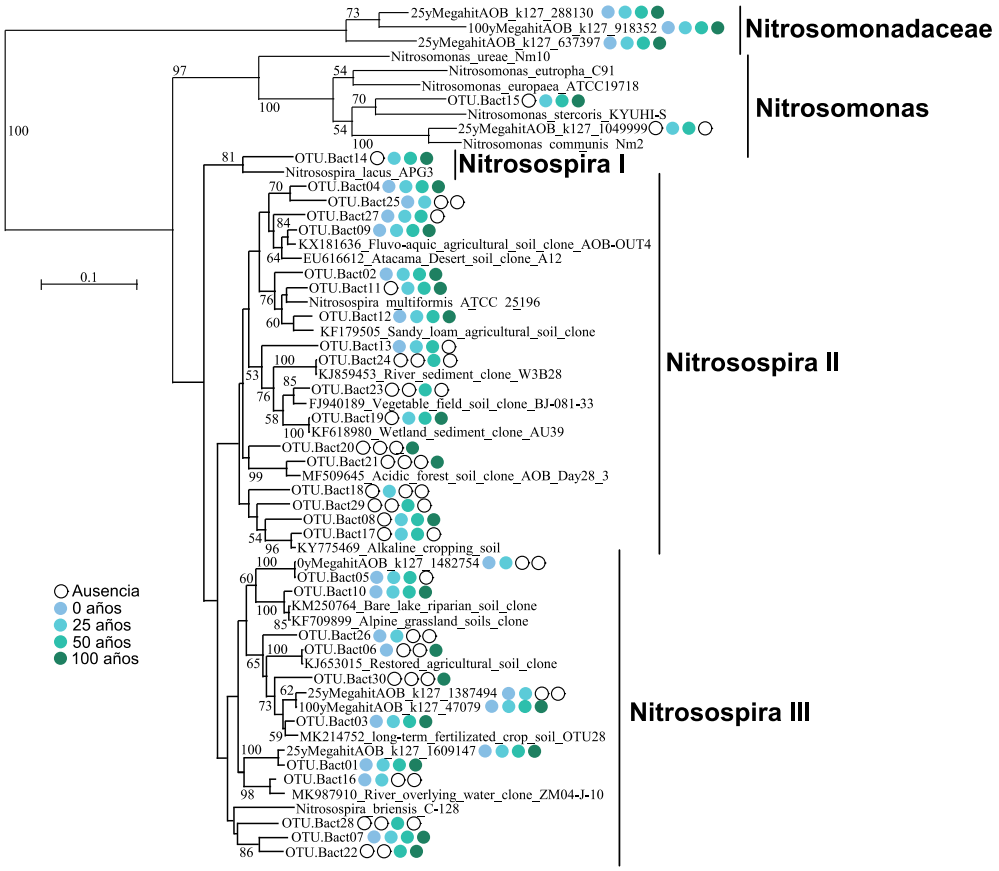

Figura 25. Árbol filogenético construido con secuencias *amoA* de AOB provenientes de la secuenciación de amplicones y de los metagenomas bajo el método Neighbor Joining usando Kimura 2-P (K2P) como modelo de distancia. Bootstrap ≥ 50% (1000 réplicas).

9.3 Efecto del cambio de la calidad de agua de riego en oxidadores de amonio en suelos regados con agua residual.

Para evaluar el efecto del cambio de calidad del agua de riego sobre una comunidad oxidadora de amonio de suelos irrigados por 100 años con agua residual, se llevó a cabo un experimento de riego bajo condiciones controladas. Columnas de suelo de 30 x 15 cm

colectadas de los primeros 25 cm de suelos previamente clasificados como feozems de tres diferentes sitios (LP: Las Palmas, B: Bojayito, y UT: Ulapa-Tetepango) fueron sometidas a 18 eventos de riegos continuos (cada 10 días) con agua residual y agua proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales Atotonilco.

9.3.1 Variaciones en la abundancia relativa de organismos oxidadores de amonio en los suelos

A partir de las secuencias del gen 16S rRNA se calcularon las abundancias relativas de las AOA y AOB. En general, las AOA tuvieron una mayor abundancia relativa en comparación con las AOB. La abundancia relativa de AOA osciló entre el 5 y el 20%, y llegó a tener picos por encima del 30% en promedio, mientras que, en las AOB la abundancia nunca superó el 4%. En casi todas las muestras evaluadas, *Nitrosocosmicus* fue el género de AOA predominante seguido por miembros ambientales de la familia Nitrososphaeraceae, y en menor grado *Nitrososphaera* (**Fig. 26**). Las AOB más abundantes fueron aquellas asociadas al género *Nitrosospira*, aunque en algunos casos específicos bacterias del género MND1 fueron las AOB dominantes (**Fig. 26**).

La fluctuación en las abundancias relativas de las AOA y AOB fue propia de cada uno de los sitios estudiados. Primeramente, al ser columnas inalteradas, las abundancias relativas iniciales (R0 = Riego cero) son diferentes entre las columnas y por lo tanto las variaciones tienden a ser diferentes. Por ejemplo, en Bojayito la abundancia de AOA en los suelos irrigados con agua residual (WW) disminuye posterior a los riegos hasta el evento de riego 12 (R12, donde la R es la abreviatura de riego), donde ésta crece de forma exponencial hasta 3 veces la abundancia (30%), para después estabilizarse en el R18. En comparación con los suelos irrigados con agua de la planta de tratamiento (TW), donde a partir del R03, la abundancia de AOA se incrementa de forma gradual teniendo un pico en R15 (**Fig. 26a**). En Las Palmas no hubo cambios notables en la abundancia relativa de los grupos, sin importar el evento de riego o la calidad de agua usada en este (**Fig. 26b**). Las AOA presentes en Ulapa-Tetepango aumentaron su abundancia relativa posterior al riego en ambas calidades de agua. En las muestras irrigadas con TW el incremento en R15 y R18 se mantiene hasta 6 veces más con relación al R0 (**Fig. 26c**).

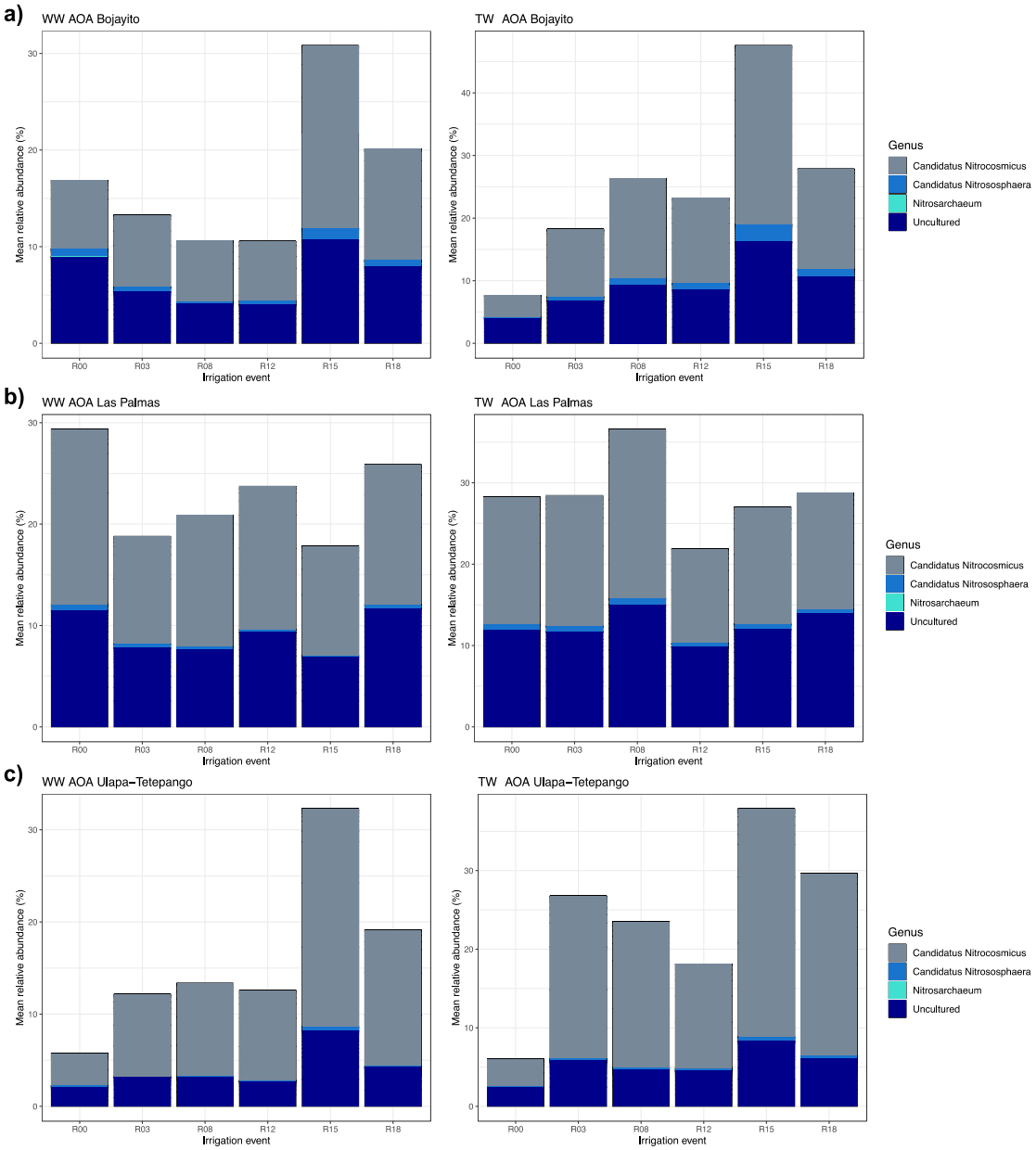

Figura 26. Abundancias relativas de AOA en muestras de suelos de los diferentes sitios durante los diferentes eventos de riego. a) Suelos de Bojayito bajo riego con Agua residual (WW) y Agua de la planta de tratamiento (TW), b) Las Palmas, y c) Ulapa-Tetepango.

Los eventos de riego en general tuvieron un efecto drástico sobre las AOB en Bojayito, ya que partieron de una dominancia del grupo MND1 hacia su casi nula detección. En los suelos irrigados con WW, la abundancia cae del 2.5% hasta menos del 0.5% en el R03, sin embargo, ésta parece recuperarse con el pasar de los riegos llegando hasta el 1% en el R15, aunque con una mayoría de *Nitrosospira* (**Fig. 27a**). En Las Palmas, la abundancia relativa de las AOB se incrementó posterior a los eventos de riego sin importar la calidad del agua usada. En ambos casos *Nitrosospira* fue el género dominante, aunque destaca la presencia de *Nitrosomonas* con una abundancia constante entre el 0.07 y el 0.15%. En los

suelos irrigados con WW el aumento de AOB es constante y de forma gradual teniendo un máximo en el R15, significando alrededor del doble en relación con el R0. Los suelos irrigados con TW tienen un incremento constante hasta el R08 (>0.6%), posteriormente se estabiliza entre el R12 y el R18 con una abundancia cercana al 0.4% (**Fig. 27b**). Los eventos de riego en las columnas de suelo de Ulapa-Tetepango tuvieron un efecto similar al de Bojayito. En este sitio, las AOB tuvieron la abundancia relativa más alta de los R0 (3 – 4%). Posterior al evento de riego el taxón MND1 decrece su abundancia, y es sustituido por *Nitrosospira*. En los suelos irrigados con WW, la abundancia relativa no es estable y oscila entre menos del 0.5% y el 1%. Por otro lado, en los suelos regados con TW a pesar de las oscilaciones, se observa una tendencia en la disminución hacia el R18 de estos grupos oxidadores de amonio hasta menos de la mitad en comparación con R03 (**Fig. 27c**).

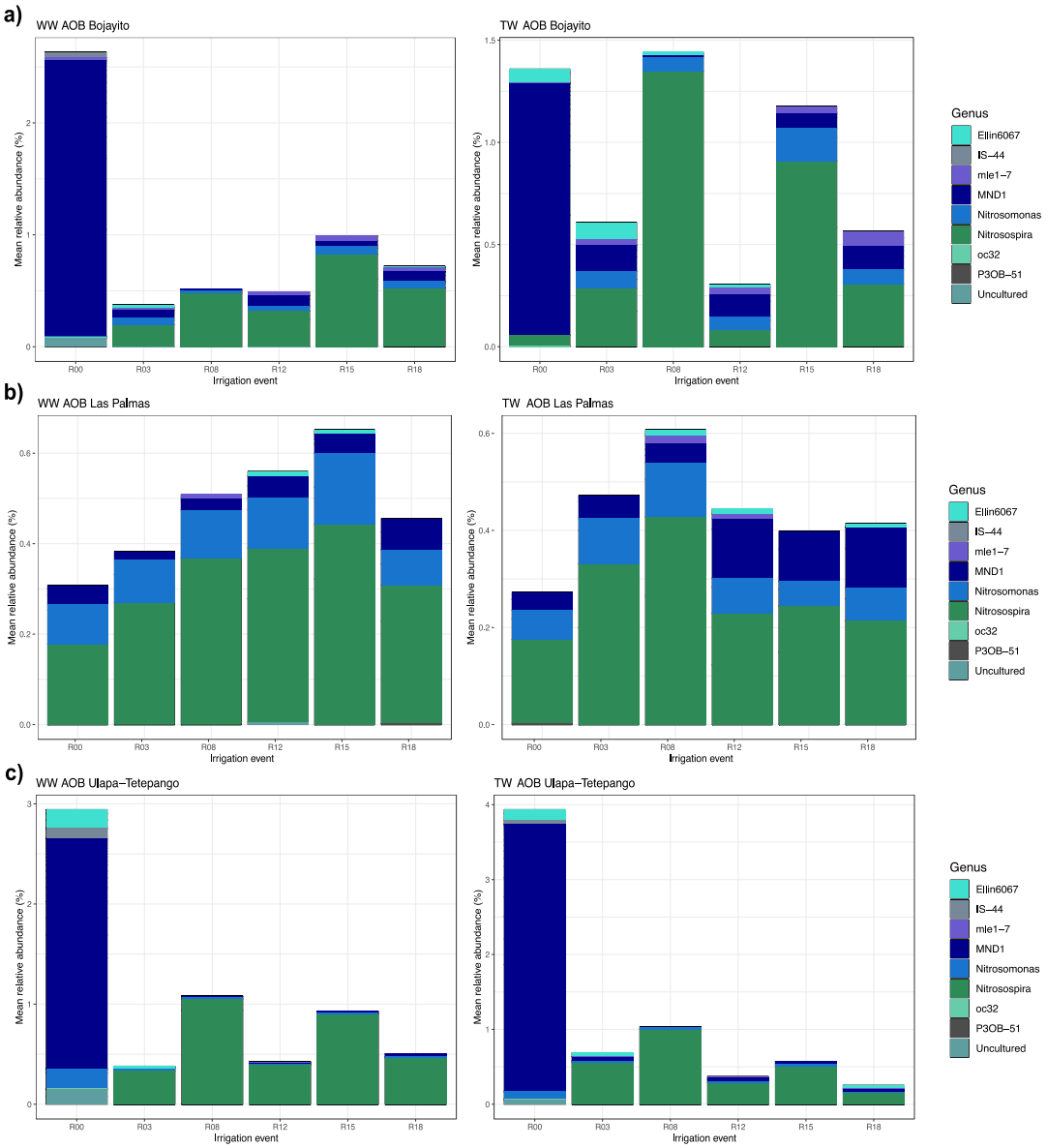

Figura 27. Abundancias relativas de AOB en muestras de los suelos de los diferentes sitios durante los diferentes eventos de riego. a) Suelos de Bojayito bajo riego con Agua residual (WW) y Agua de la planta de tratamiento (TW), b) Las Palmas, y c) Ulapa-Tetepango.

9.3.2 Efecto del agua de la planta de tratamiento sobre la estructura de la comunidad oxidadora de amonio

Los suelos fueron sometidos a eventos de riego continuos con agua residual (WW) y agua proveniente del efluente de la planta de tratamiento de agua (TW). Se llevaron a cabo muestreos cada 3 riegos para evaluar el efecto sobre la estructura de la comunidad oxidadora de amonio.

La estructura de la comunidad de AOA en los suelos de Bojayito cambia posterior a los riegos con ambas calidades de agua explicado por un 60% de variación. Posteriormente la variación es gradual entre los riegos llevando a una ligera separación con los suelos irrigados con agua de la planta de tratamiento en el R18 (**Fig. 28a**). En Las Palmas, la estructura de las AOA no presenta un patrón claro entre los componentes del análisis, aunque la mayor variación se observa en los suelos de R12 y R15, comparando aquellos que fueron regados con agua residual y agua de la planta de tratamiento (**Fig. 28b**). En Ulapa-Tetepango se nota un patrón similar al de Bojayito. Existe una variación entre las muestras de R0 y las de los riegos posteriores explicadas por un 91% de variación, sin embargo, entre los riegos los cambios son mínimos destacando la ligera separación de los suelos irrigados con agua de la planta en el evento R15 y R18 (**Fig. 28c**).

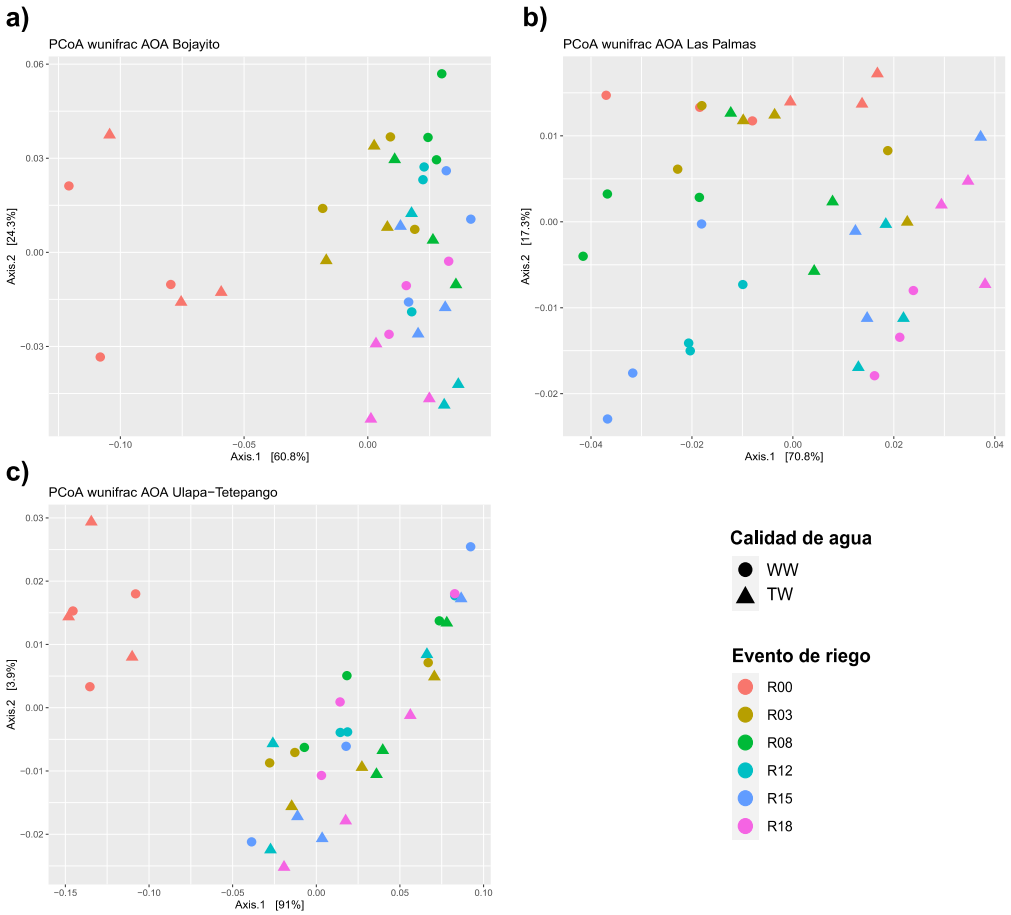

Figura 28. Análisis de coordenadas principales de grupos oxidadores de amonio arqueanos durante los riegos realizados en los diferentes suelos. a) Bojayito, b) Las Palmas, y c) Ulapa-Tetepango.

La comunidad bacteriana de oxidadoras de amonio en Bojayito se separa en dos grupos, uno de los R0 y otro de los demás riegos. En cuanto a los otros riegos, la variación es gradual de acuerdo con el número de riego que corresponde siendo los suelos regados con agua de la planta en el R18 los más alejados del R0 con relación al eje horizontal (69% de variación) (**Fig. 29a**). Por otro lado, la comunidad de las AOB en Las Palmas no presentó diferencias entre los diferentes riegos, o por la calidad del agua de riego (**Fig. 29b**). En Ulapa-Tetepango también se formaron dos grupos, uno para R0 y el otro para los consecuentes riegos separados por el eje vertical (casi 29%). Posteriormente el cambio entre los riegos R03-R18 se dio se forma de gradual terminando por estar separadas las muestras de R18 de suelos regados con agua de la planta en comparación con las de R03 y R08 (67% de variación explicada) (**Fig. 29c**).

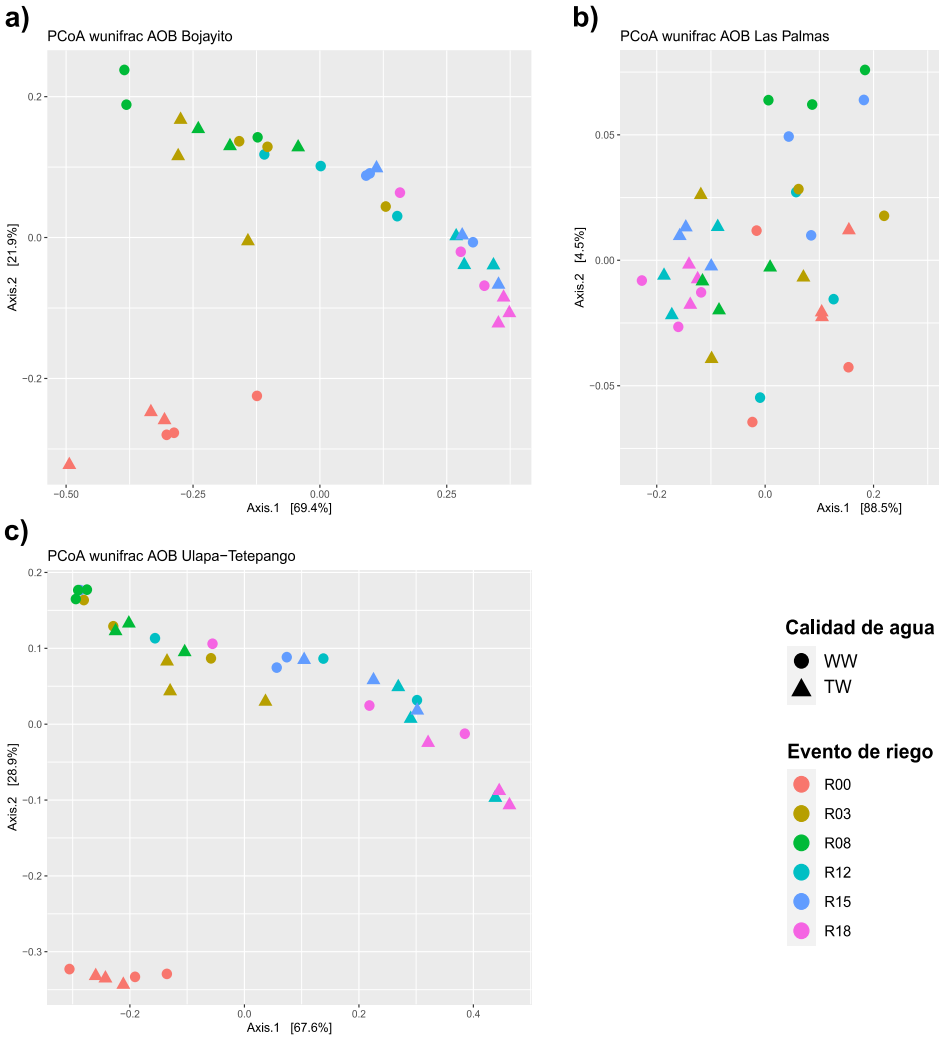

Figura 29. Análisis de coordenadas principales de grupos oxidadores de amonio arqueanos durante los riegos realizados en los diferentes suelos. a) Bojayito, b) Las Palmas, y c) Ulapa-Tetepango.

9.3.3 Impacto del cambio de calidad de agua en la abundancia de los oxidadores de amonio.

Primeramente, con base en los resultados anteriores se llevó a cabo la cuantificación del gen 16S rRNA para conocer los cambios en la biomasa procarionte de los suelos con relación a los riegos en el R0 y el R18 (**Fig. 30**). En Bojayito se encontró el suelo con el mayor número de copias registrado con alrededor de 2.5 × 10^{10} copias por gramo de suelo. Además, se observó que el número de copias del gen decrece más de 1.5 × 10^{10} copias por gramo de suelo después de los 18 riegos con agua residual, mientras que, con el agua tratada se presenta un ligero aumento no significativo (**Fig. 30a**). En Las Palmas se presentó el menor número de copias para este gen en comparación con todos los sitios estudiados. Asimismo, se observó un fenómeno similar a Bojayito en cuanto a las variaciones, aunque en menor grado ya que estas fueron más pequeñas (**Fig. 30b**). Por último, los suelos de Ulapa-Tetepango fueron los que en conjunto albergaban una mayor abundancia del gen 16S rRNA. Sin embargo, estos tuvieron pérdidas en el número de copias del gen sin importar la calidad del agua usada para el riego (**Fig. 30c**).

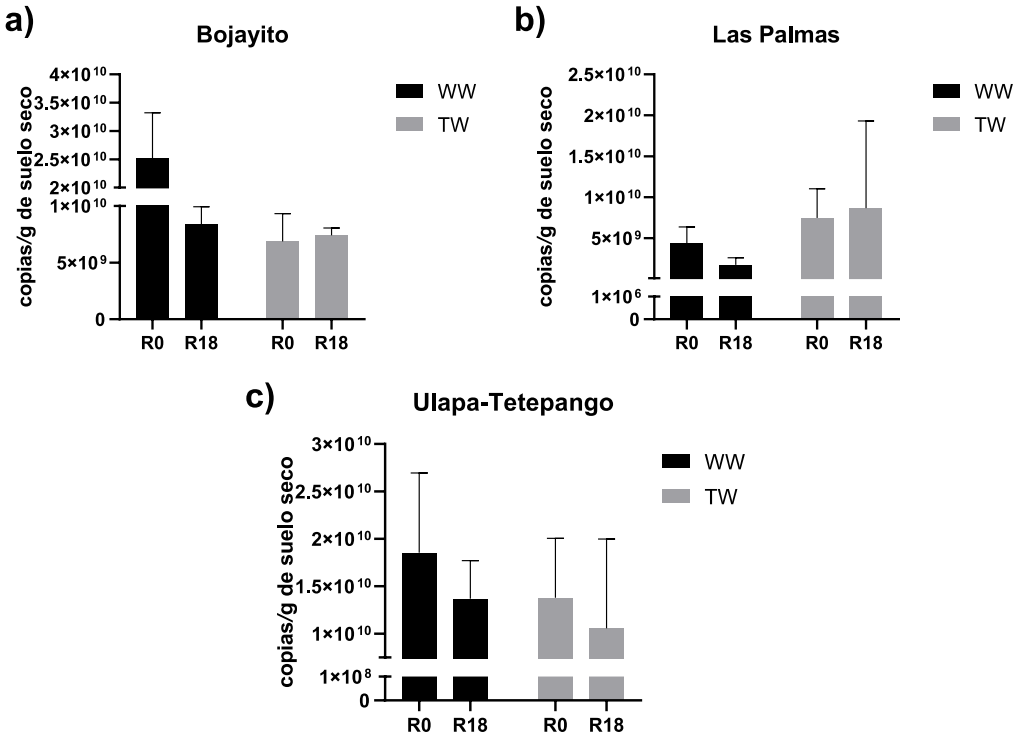

Figura 30. Cuentas absolutas del gen 16S rRNA de los diferentes suelos estudiados en los eventos de riego inicial (R0) y final (R18). a) Bojayito, b) Las Palmas, y c) Ulapa-Tetepango. WW=Agua residual, TW= Agua de la planta de tratamiento. * = p<0.05, Prueba Mann-Whitney

Posteriormente, se llevó a cabo a la cuantificación del gen *amoA* arqueano y bacteriano bajo los dos tratamientos, de igual forma, en los tiempos iniciales (R0) y el final (R18). De forma inicial se observó que los suelos de las Palmas fueron aquellos que albergaban un mayor almacén genético del gen *amoA* de AOA en comparación con los otros sitios promediando más de 1.3 × 10^9 copias por gramo de suelo. Después de Las Palmas,

Bojayito estuvo con poco más de1 × 10^9 copias por gramo de suelo y Ulapa-Tetepango con alrededor 5.5 × 10^8 copias por gramo de suelo.

Posterior a los 18 eventos de riego, la abundancia del gen *amoA* de AOA disminuyó de forma significativa en los suelos irrigados con agua residual de Bojayito (**Fig. 31a**). Así mismo en Las Palmas, ya que, aunque la disminución no fue significativa (**Fig. 31b**). En Ulapa-Tetepango por el contrario se detectó un incremento en la abundancia génica, aunque no de forma significativa. Los riegos con agua de la planta de tratamiento por el contrario indicaron un aumento en el número de copias de forma marcada en Bojayito, y en menor grado en Ulapa-Tetepango (**Fig. 31a y c**). Mientras que en Las Palmas no existió variación considerable en la abundancia del gen (**Fig. 31b**).

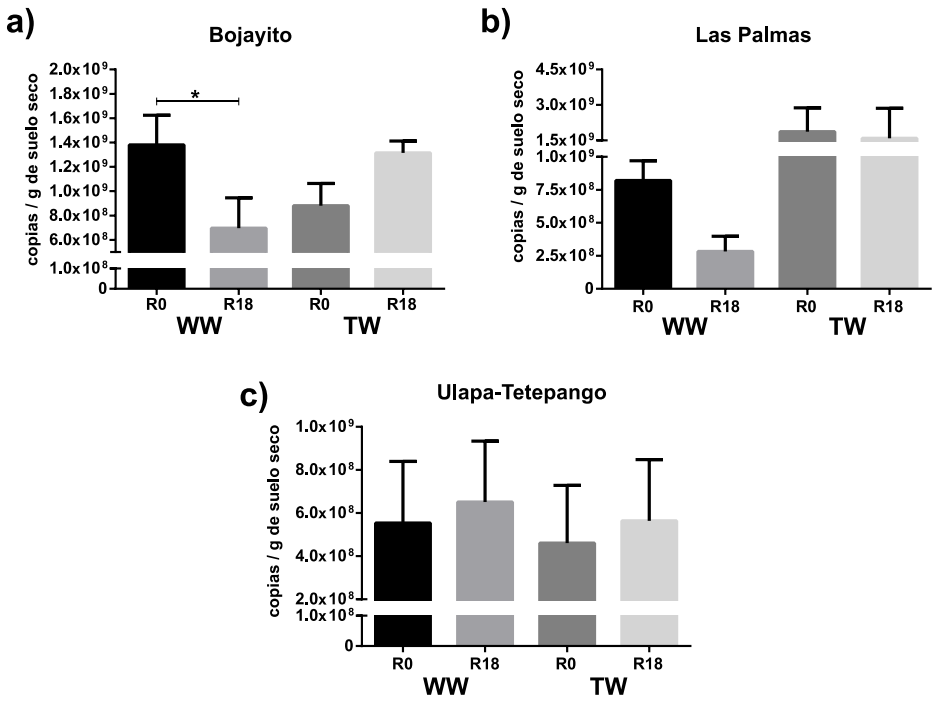

Figura 31. Cuentas absolutas del gen *amoA* de AOA de los diferentes suelos estudiados en los eventos de riego inicial (R0) y final (R18). a) Bojayito, b) Las Palmas, y c) Ulapa-Tetepango. WW=Agua residual, TW= Agua de la planta de tratamiento. * = $p<0.05$, Prueba Mann-Whitney

La abundancia de las AOB en todos los sitios en promedio rondó alrededor de las 10^8 copias *amoA* por gramo de suelo. En los suelos de Bojayito, el agua residual incrementó la abundancia absoluta del gen *amoA* hacia el R18. De igual manera, el riego con agua de la planta de tratamiento incrementó la abundancia del gen a más del doble, por lo que este fue significativo (**Fig. 32a**). En Las Palmas, la abundancia de AOB fue el menor en comparación con los otros sitios estudiados (**Fig. 32b**). En estos suelos el constante pulso con agua residual llevó a un decremento de casi la mitad de las copias gen *amoA*, significando 2 × 10^7 copias por gramo de suelo menos. Sin embargo, el uso de agua de la

planta no significó ningún cambio significativo en la abundancia de las AOB. Por último, los suelos de Ulapa-Tetepango fueron los que en conjunto tuvieron la mayor concentración de AOB. Para estos suelos las variaciones en general no fueron significativas, aunque los patrones indicaban un incremento en la abundancia de *amoA* posterior a los eventos de riego con agua residual, mientras que, por el contrario, el uso de agua de la planta sugiere un descenso en la abundancia de dicho gen en hasta 2 × 10^8 copias por gramo (**Fig. 32c**).

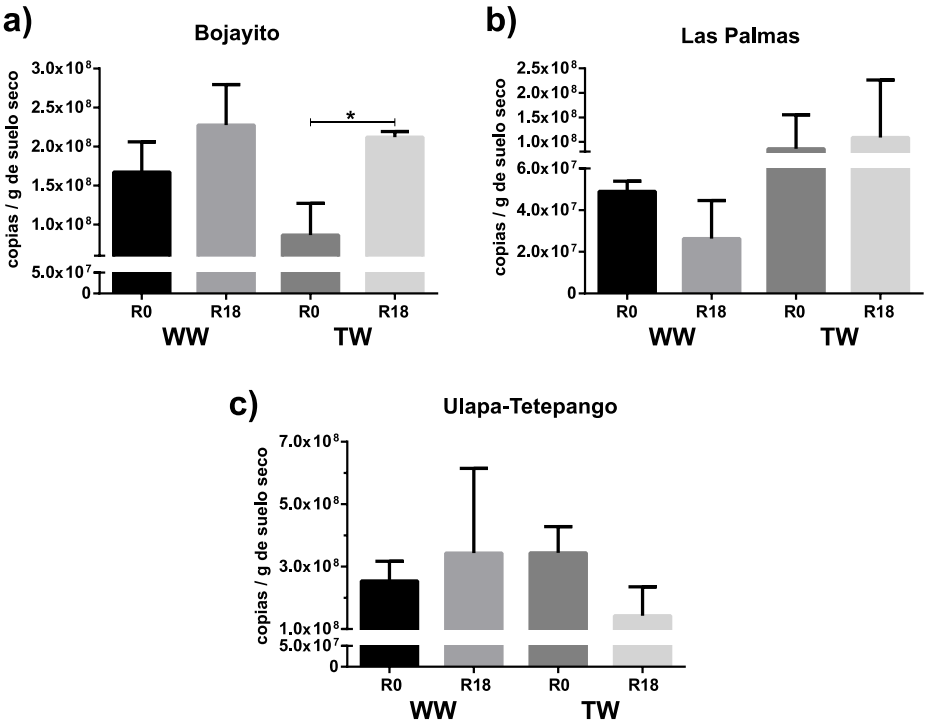

Figura 32. Cuentas absolutas del gen *amoA* de AOB de los diferentes suelos estudiados en los eventos de riego inicial (R0) y final (R18). a) Bojayito, b) Las Palmas, y c) Ulapa-Tetepango. WW=Agua residual, TW= Agua de la planta de tratamiento. * = $p<0.05$, Prueba Mann-Whitney

A partir de las cuentas anteriores, se calculó un cociente de los genes *amoA* con el gen constitutivo 16S rRNA y entre sí, para evaluar la razón de cambio entorno un gen relacionado. Para las AOA, se observó que en Bojayito y Ulapa-Tetepango la razón se incrementa con el tiempo de riego, sin importar la calidad de agua que se use para el riego. Caso contrario en Las Palmas, donde el cociente disminuye con los riegos, aunque el correspondiente al agua de la planta de tratamiento tiene una pendiente más pronunciada (**Fig. 33a**). Las AOB en Bojayito se incrementan drásticamente con relación a la abundancia del gen 16S rRNA sin importar la calidad de agua usada en el riego casi en la misma tasa de incremento. En Las Palmas, las AOB se desarrollan igualmente sin importar la calidad del agua, aunque la pendiente de los suelos regados con agua residual tiene un crecimiento hacia el R18 en comparación con los regados con agua de la planta de tratamiento. En Ulapa-Tetepango por otro lado, la calidad del agua tiene un efecto contrastante en la

abundancia relativa, ya que la abundancia se incrementa de forma drástica en suelos regados con agua residual, mientras que, en los suelos irrigados con agua de la planta decrece súbitamente (**Fig. 33b**). Posteriormente se evaluó la relación entre la cantidad de *amoA* de AOA y AOB para evaluar la tasa de cambio entre ambos. En Bojayito y Las Palmas la razón entre AOA y AOB decrece a la misma tasa entre los suelos regados con agua residual y de la planta hacia el riego 18. En Bojayito la relación inicial era alrededor de 10:1, y disminuye hasta 5:1 en promedio. En Las Palmas la relación era mayor, en promedio partía de 20:1 en R0; con el paso de los eventos de riego disminuye hasta alrededor de 15:1. En Ulapa-Tetepango la relación se comporta de manera inversamente reciproca entre la calidad del agua de riego. En este caso la razón inicial en los suelos irrigados con agua residual es de 2.5:1 y disminuye a 2:1, mientras que en los que son regados con agua de la planta de tratamiento parten de 1.5:1 y se elevan hasta 4:1 (**Fig. 33c**).

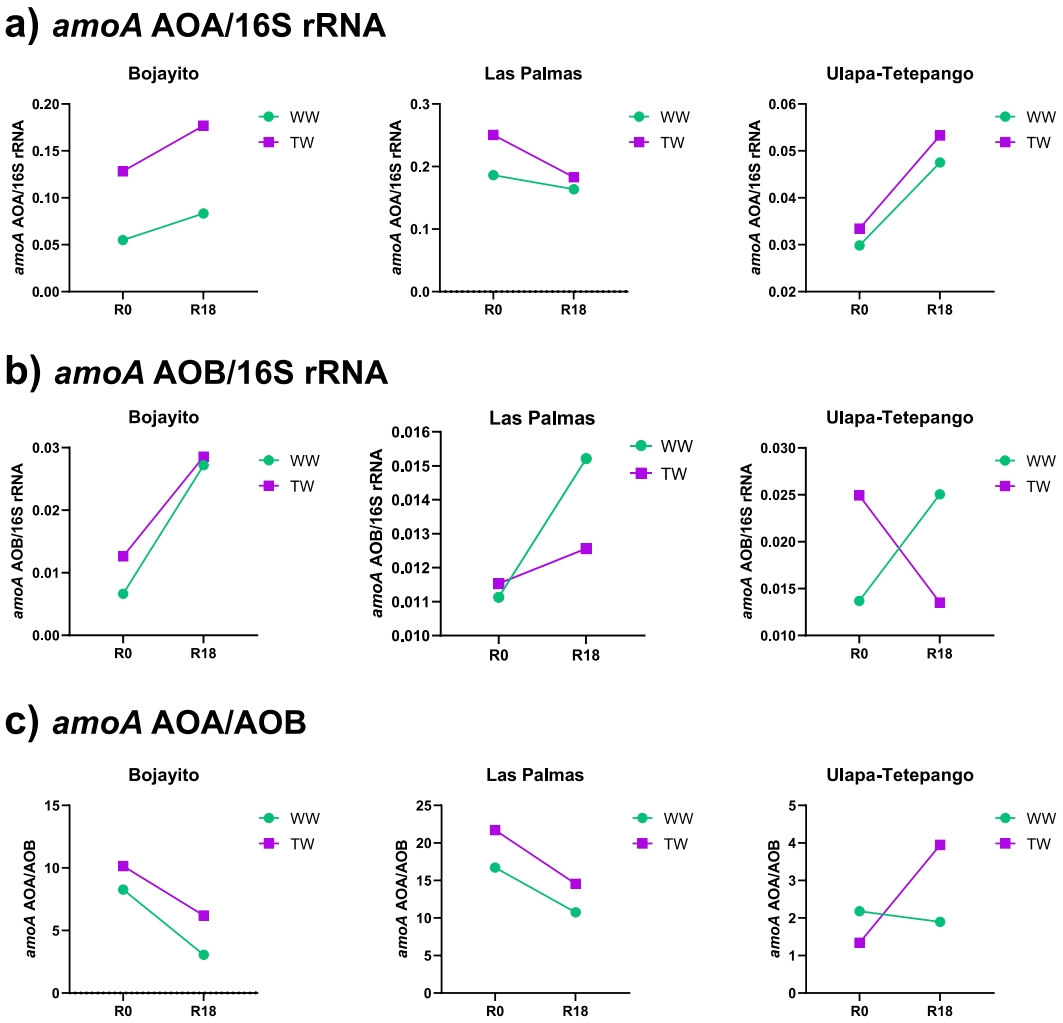

Figura 33. Relación entre la abundancia de los genes *amoA* con el gen constitutivo 16S rRNA, así como entre AOA y AOB. a) Relación entre el número de cuentas de los genes *amoA* AOA y 16S rRNA, b) *amoA* AOB y 16S rRNA, y c) *amoA* AOA y AOB.

9.3.4 Correlación de los grupos oxidadores de amonio con el ambiente fisicoquímico del suelo

Se llevó a cabo la medición de carbono (Ct) y nitrógeno total (Nt) en las muestras de los suelos en los R0 y R18. En ella se observó que el Ct disminuyó conforme se llevaban a cabo los riegos, aunque el uso de agua de la planta de tratamiento disminuyó en mayor grado el almacén de carbono en Bojayito y Ulapa-Tetepango, caso contrario en Las Palmas. El nitrógeno por otra parte no varió de forma significante en los suelos de Bojayito sin importar la calidad del agua de riego. En Las Palmas por otro lado se incrementó la cantidad de N, siendo más notorio en los suelos irrigados con agua de la planta de tratamiento. En Ulapa-Tetepango los riegos disminuyeron la concentración de N en el medio disminuyó de igual forma en los suelos regados con agua residual y de la planta (**Tabla 8**).

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos de los suelos regados por ~100 años y estudiados en los experimentos de riegos constantes.

		Bojayito		Las Palmas		Ulapa-Tetepango	
		R0*	R18	R0*	R18	R0*	R18
Ct (%)	WW	2.83	2.54	1.63	1.58	2.62	2.07
	TW	2.83	2.36	1.63	1.76	2.62	2.03
Nt (%)	WW	0.27	0.28	0.16	0.19	0.28	0.25
	TW	0.27	0.27	0.16	0.22	0.28	0.25

*Obtenidos y compilados de la tesis de grado de Mercedes Álvarez Olivares (2023).

A partir de dichas cuantificaciones se realizaron análisis de correspondencia canónica (CCA) para correlacionar dichas cuantificaciones con los grupos oxidadores de amonio identificados mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Las AOA en Bojayito el Nt tuvieron una correlación significante con las muestras irrigadas con agua residual en el R18, mientras que, el Ct está más cercano a las muestras del R0 en general. En Las Palmas, tanto el Nt y el Ct se correlacionaron de forma significante con muestras de R18 de suelos irrigados con agua de la planta de tratamiento. En Ulapa-Tetepango, el Ct estuvo cercano a las muestras del R0 en general, mientras que, el Nt se asoció en particular con una muestra irrigada con agua residual en el R18 (**Fig. 34**).

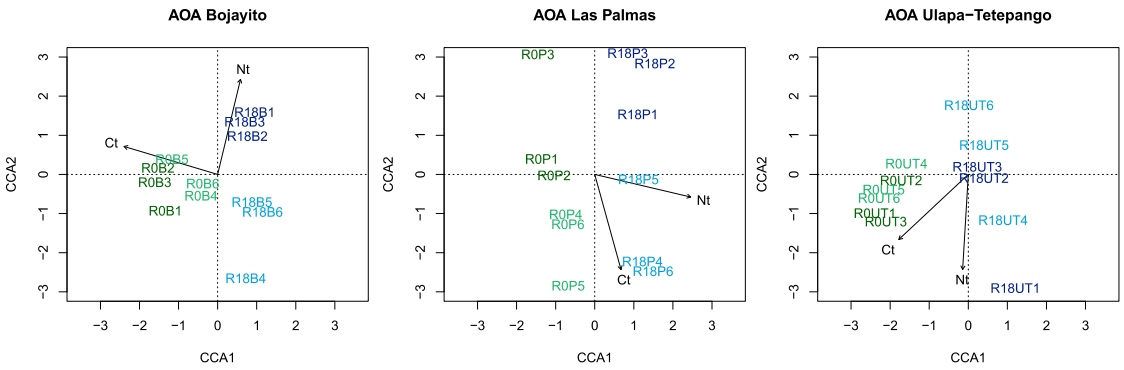

Figura 34. Análisis de correspondencia canónica (CCA) de las AOA en los diferentes suelos con historial del riego por más de 100 años. R0= Riego inicial, R18=Riego final, 1-3 =irrigadas con WW, 4-6 = irrigadas con TW.

En el caso de las AOB (**Fig. 35**), su presencia y abundancia en Bojayito en el R0 se asoció fuertemente con el Ct, mientras que, el Nt estuvo más cercano a muestras irrigadas con agua residual después de 18 eventos de riego (R18). En los suelos de Las Palmas, tanto el Ct como el Nt estuvieron correlacionados de forma significante con suelos regados con agua residual después de los 18 riegos (R18). Finalmente, en Ulapa-Tetepango, la estructura de la comunidad de las AOB en el R0 tuvo una cercanía significativa con las mediciones de Ct y Nt.

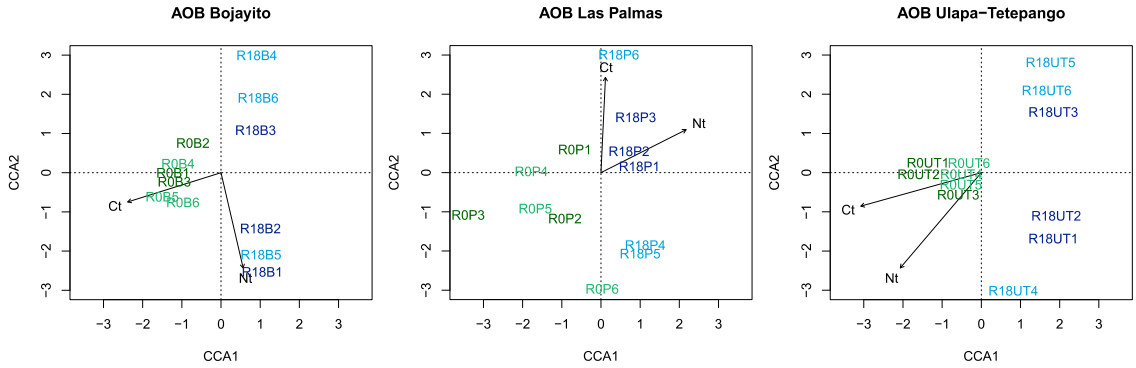

Figura 35. Análisis de correspondencia canónica (CCA) de las AOB en los diferentes sitios suelos con historial del riego por más de 100 años. R0= Riego inicial, R18=Riego final, 1-3 =irrigadas con WW, 4-6 = irrigadas con TW.

10 Discusión

El Valle del Mezquital alberga el distrito de riego 03 desde 1912, que se caracteriza por utilizar aguas residuales provenientes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México sin un tratamiento formal previo. Debido al historial de la zona, se han llevado a cabo estudios enfocados en la microbiota del suelo. Los estudios que sugieren cambios en el perfil funcional microbiano se encuentran limitados, los cuales se basaban en el cálculo de las actividades enzimáticas, a la par de la determinación de la biomasa y respiración en suelos irrigados en diferentes tiempos (Friedel et al., 2000). Recientemente, con el uso de tecnologías de secuenciación masiva se pudo observar el efecto de la calidad del agua de riego en la estructura y perfil funcional de la comunidad microbiana (Lüneberg et al., 2018, 2019) en estos suelos.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto que ha tenido el riego con agua residual a lo largo de los años sobre el perfil funcional microbiano en suelos del Valle del Mezquital, enfocándose en los oxidadores de amonio de forma primordial, ya que son organismos clave del ciclo biogeoquímico del nitrógeno utilizando diferentes perspectivas que involucraron secuenciación masiva de genes de forma dirigida y amplia (metagenómica). Adicionalmente se investigó el efecto del cambio en la calidad del agua en las comunidades oxidadoras de amonio establecidas. A continuación, se discuten los resultados generados para responder a cada una de las hipótesis previamente planteadas.

10.1 La comunidad oxidadora de amonio cambia con el tiempo bajo riego con agua residual.

Estudios previos han mostrado que el uso de agua residual provoca cambios en las características fisicoquímicas del suelo (Sánchez–González et al., 2017; Siebe y Fischer, 1996) y en la biota del suelo (Friedel et al., 2000). Un reporte reciente encontró que el uso continuo de agua residual en el suelo cambia la estructura de la comunidad bacteriana, teniendo como efecto secundario cambios en su perfil funcional. Una de las predicciones del perfil funcional es el incremento en la nitrificación en suelos irrigados con agua residual en comparación con aquellos de temporal o regados con agua de pozo (Lüneberg et al., 2018). Dicha predicción se le dio seguimiento en el presente estudio, encontrando lo siguiente.

La abundancia relativa de potenciales oxidadores de amonio arqueanos y bacterianos se incrementa paulatinamente en los suelos irrigados con agua residual en comparación con los de temporal. La abundancia de las AOA aumenta en las parcelas regadas y tiene su máximo en los suelos irrigados por 50 años, mientras que en las AOB el aumento de la abundancia es gradual hacia los suelos irrigados por 100 años. Un patrón similar se observó en las cuentas absolutas de los genes *amoA* de AOA y AOB, que por lo regular son considerados como reporteros de la abundancia y composición de la comunidad oxidadora de amonio (Wessén y Hallin, 2011). El incremento en la abundancia de las AOA tiene su pico más alto en los suelos irrigados por 50 años, llegando a ser el único significantemente diferente con las abundancias de los suelos de 0 y 25 años. Este pico se correlaciona positivamente con el carbono total y la fracción orgánica, cuyo pico también se observa en los suelos regados por 50 años. Dicha correlación podría explicar el aumento en la abundancia de las AOA, ya que estas son consideradas como mixótrofas, por lo que tienen la capacidad de poder asimilar pequeñas moléculas orgánicas, que pueden ser aportadas directamente por el riego (Jia y Conrad, 2009; Sun et al., 2019). Cabe recalcar que, hacia los 100 años, el número de copias del gen *amoA* de AOA se duplica con relación a los suelos de temporal (1.28×10^6 a 2.61×10^6 copias por gramo de suelo), colocándose en el

rango de copias encontradas en sistemas similares como arrozales expuestos a aguas residuales o pastizales contaminados con metales por largos periodos de tiempo (Li et al., 2020; Mertens et al., 2010).

Las variaciones en la abundancia de las AOB presentan un comportamiento diferente al observado en AOA. En términos generales el número de copias de los suelos de temporal era relativamente bajo en comparación con otros suelos no impactados (Vela-Cano et al., 2018). Posteriormente, la abundancia del gen *amoA* crece gradualmente conforme se acumulan los años de riego siendo estadísticamente diferente hasta los 50 y 100 años de riego. En el caso de los 100 años de riego el aumento es de casi un orden de magnitud en comparación con los suelos de temporal, manteniéndose en un promedio por encima del 2×10^6 copias por gramo de suelo. Dichas estimaciones posicionan a este número de copias en un rango similar a arrozales sometidos a riegos con agua residual (Li et al., 2019; M. Li et al., 2020). Este aumento detectado en la abundancia absoluta en los suelos irrigados se encuentra correlacionado con el cambio en el pH y la entrada en gran magnitud de formas reducidas de nitrógeno en los riegos (Nicol et al., 2008).

Además de la abundancia de los microorganismos oxidadores de amonio, la diversidad de estos también se podría ver comprometida producto de la irrigación. Los cálculos de diversidad del presente estudio no arrojaron diferencias significativas, salvo una disminución en los 25 años de irrigación en ambos casos (AOA y AOB). Al igual que en el estudio de (Ibekwe et al., 2018), los suelos bajo irrigación presentaron un incremento en su abundancia relativa y absoluta en comparación con aquellos de temporal. Sin embargo, estudios previos en suelos agrícolas irrigados mostraban resultados contrastantes. En suelos donde había sido usada agua residual cruda si había una respuesta con relación a la diversidad, registrándose un aumento significativo en el índice de Shannon (Lüneberg et al., 2018), mientras que, cuando el agua había sido previamente tratada no había indicios de influencia de la calidad del agua riego sobre la diversidad microbiana (Ibekwe et al., 2018). Sin embargo, este último encontró un aumento en la abundancia relativa en grupos nitrificadores con base en secuencias del gen 16S rRNA en los suelos agrícolas irrigados con agua tratada por medio año.

Otro cambio ocasionado por el uso continuo de agua residual se ve reflejado en la estructura de la comunidad de las AOA y AOB. En ambos casos las muestras pueden dividirse en dos grandes grupos, uno para los suelos de temporal y otro para los suelos que han tenido contacto con agua residual. Estos grupos se encuentran fuertemente soportados por un análisis estadístico (**Tabla 7**), que describe diferencias significativas con base en la presencia y ausencia de ASV. A pesar de ello, no existen estudios suficientes que describan este mismo proceso, por lo que fue necesario encontrar un análogo a la irrigación con aguas residuales en sistemas similares para poder compararlos.

Dicho análogo es el uso de fertilizantes, que al igual que las aguas residuales proporcionan una entrada de compuestos orgánicos y de nitrógeno (Kiziloglu et al., 2008; Ribas et al., 2010). El uso de fertilizantes puede producir efectos antagónicos sobre las AOA en relación con la naturaleza del suelo, ya que en suelos forestales no hubo un efecto significativo, mientras que, en arrozales si tuvo un efecto notable sobre la estructura de la comunidad (Chen et al., 2011; Wertz et al., 2012). Esto puede deberse a la sensibilidad propia de las AOA a grandes entradas de N, sobre todo en sistemas circumneutrales y ligeramente ácidos (Ying et al., 2017). Para los suelos estudiados, la estructura de las AOA cambia por las características fisicoquímicas adquiridas en los suelos irrigados ya que comparten un manejo similar al de los arrozales, además de cambiar de un ambiente circumneutral en los suelos de temporal a uno ligeramente alcalino en los suelos irrigados.

La estructura de la comunidad de las AOB también se alteró posterior al uso de agua residual. Se pudieron observar dos grupos bien definidos con soporte estadístico correspondientes a los suelos de temporal y los irrigados con agua residual, sin embargo, este último no fue homogéneo como el de AOA, ya que las muestras de suelos irrigados por 100 años se separaron ligeramente de aquellas que representan los 25 y 50 años. Aunado a la mayor abundancia del gen *amoA*, también se sugiere que se puede formar un nuevo grupo relacionado a AOB en el futuro si los riegos se mantienen. Esto se vio respaldado por estudios previos, que demostraron que el uso constante de fertilizantes tuvo efecto sobre la estructura de la comunidad y el potencial funcional de estos microorganismos. Particularmente, se observó en suelos de arrozales cuya fertilización acumulada a lo largo de los años con urea y materia vegetal tiene un efecto directo sobre la estructura de la comunidad AOB, así como incrementar su abundancia en relación con el número de copias *amoA* (Wu et al., 2011), complementado por un estudio en suelos forestales donde el potencial oxidador de amonio bacteriano se incrementa con la fertilización regular (Wertz et al., 2012).

La composición de los grupos oxidadores de amonio fue asignada a partir de la similitud de las secuencias *amoA* correspondientes a cada OTU de AOA y AOB con secuencias previamente identificadas en bases de datos establecidas. Los OTUs AOA fueron asignados en los dos géneros de AOA más comunes del suelo: *Nitrosocosmicus* y *Nitrososphaera* (Huang et al., 2021). El grupo correspondiente a *Nitrososphaera* fue el más diverso al albergar el 86% de los OTUs encontrados, y por ende ser el más abundante. Esta dominancia en cuanto a diversidad y abundancia se ha encontrado en otros suelos agrícolas, indicando la importancia de dicho taxón en este tipo de suelos (Staley et al., 2018; Zhalnina et al., 2014). El grupo de *Nitrososphaera* fue a su vez subdividido en cuatro, dependiendo de la cercanía con secuencias proveniente de aislados de diferentes ambientes, basándose en el hecho de que los organismos pertenecientes a este grupo responden a diferentes estímulos ambientales como temperatura y humedad (Jiang et al., 2014). El subgrupo I de *Nitrososphaera* agrupó 5 OTUs con muestras ambientales relacionadas a medios acuáticos como suelos costeros o sedimentos. El OTU.Arch2 asociado a un aislado de suelo agrícola fue el dominante en el subgrupo y marcó la tendencia de decrecimiento en la abundancia relativa gradualmente conforme a los años de riego. El subgrupo II fue el más abundante sobre todo por la presencia de los OTU.Arch01 y 03. En este grupo se destacan la afiliación a secuencias provenientes de suelos de arrozales y agrícolas restaurados. La abundancia tiende a incrementarse ligeramente hacia los suelos irrigados, debido al aumento del OTU.Arch01 que fue el más numeroso en general. De acuerdo con la topología del árbol dicho OTU se encontraba cercano a un MAG proveniente de suelos agrícolas intensivos, lo que podría explicar su aumento en los suelos irrigados. El otro OTU dominante fue el OTU.Arch03, solo que su abundancia disminuye posterior al uso de agua residual. En este caso el OTU se encuentra más cercano a un aislado proveniente de un suelo agrícola que abandonó el manejo intensivo y fue restaurado, por lo que este OTU podría ser sensible al efecto que causan este tipo de gestiones agrícolas sobre el suelo (Chen et al., 2015). El subgrupo III fue el tercero en cuanto a abundancia a pesar de contener 7 OTUs diferentes. La abundancia de este decrece a partir de los 25 años de riego y se mantiene hacia los 50 años, aunque al final se recupera en los 100 años. Las secuencias pertenecientes a este subgrupo pertenecen al grupo definido en la literatura como *Nitrososphaera* subgrupo 1.1 que contiene a *Nitrososphaera viennensis* y *Nitrososphaera gargensis*, dos de las especies más comunes en suelos, sin embargo, la abundancia del grupo no fue preponderante al solo alcanzar 10% (Pester et al., 2012). El último subgrupo de *Nitrososphaera* solo tuvo representativos en los suelos irrigados por 50 y 100 años, probablemente por su relación a

una clona proveniente de suelos agrícolas con manejo intensivo. El grupo de OTUs asignado a Nitrosocosmicus tuvo una abundancia relativa baja (< 0.5%), a pesar de ser uno de los géneros más abundantes en ambientes edáficos (Clark et al., 2021). Su relación cercana con *Nitrosocosmicus franklandus*, una AOA con capacidad ureolítica y resistencia a altas concentraciones de amonio les permitió adaptarse a los suelos irrigados, donde fueron detectadas en el presente estudio (Lehtovirta-Morley et al., 2016).

Los OTUs de AOB fueron asignados a dos géneros bacterianos: *Nitrosospira* y *Nitrosomonas*. Las *Nitrosomonas,* a pesar de ser reconocidas como un género cosmopolita, no tienden a ser de las más abundantes en ambientes edáficos (Taylor y Bottomley, 2006). Sin embargo, su abundancia relativa encontrada en los suelos estudiados fue menor a lo esperado, por lo que puede ser un sesgo metodológico producto de los cebadores utilizados (Orschler et al., 2020). Este grupo solo contiene un OTU que se encuentra presente en los suelos irrigados con agua residual. Esto puede deberse a su cercanía con *Nitrosomonas stercoris,* una bacteria aislada de composta originada de estiércol, pero que igual ha sido encontrada en aguas residuales y plantas de tratamiento, por lo que puede ser introducida mediante los riegos (Nakagawa et al., 2019; Nakagawa y Takahashi, 2015). *Nitrosospira* es reconocida como la AOB más abundante en suelos, y en concordancia con ello fue la más abundante en los suelos estudiados en el presente estudio (Habteselassie et al., 2013). El subgrupo I solo fue encontrado en suelos irrigados con agua residual, ya que su único OTU es cercano a *Nitrosospira* sp. NpAV es una bacteria aislada de suelos agrícolas con potencial ureolítico, lo cual le permite adaptarse a estos sistemas (Marsh et al., 2005; Norton et al., 2002). El subgrupo II es uno de los más abundantes y diversos; con una tendencia a incrementar su abundancia con los riegos con agua residual, ya que está relacionado a *Nitrosospira multiformis* y *Nitrosovibrio* sp. Nv4, una bacteria propia de suelos agrícolas fertilizados y otra de aguas residuales respectivamente (Elling et al., 2022; Ouyang y Norton, 2020). Lo anterior les conferiría ventajas adaptativas para desarrollarse y predominar los suelos irrigados. De forma inversa el subgrupo III decrece con el incremento de los riegos por la influencia del OTU.Bact03 y OTU.Bact05, relacionados con aislados de suelos agrícolas fertilizados por largo y ribereños de forma respectiva. Aunque cabe recalcar que en el mismo subgrupo se encuentra el OTU.Bact01, que es el OTU más abundante en general y predomina en los suelos irrigados brindando equilibrio en la abundancia general del subgrupo. Dicho OTU es cercano a aislados edáficos de zonas ribereñas ricas en nutrientes y contaminantes por lo que debe estar adaptado a suelos de manejo agrícola intensivo con riego por inundación con aguas residuales (Aguiar Jr. et al., 2015). Finalmente, el último subgrupo asocia especies de *Nitrosospira* no definidas como *Nitrosospira* sp. 56-18 y *Nitrosospira* sp. SCN18, con *Nitrosovibrio tenuis* NV1, que son especies adaptadas a la fertilización (Hu et al., 2021; Krümmel y Harms, 1982).

Los cambios anteriormente mencionados son producto del efecto del riego con agua residual en las características fisicoquímicas del suelo. En estudios anteriores se ha definido al pH como el parámetro más importante para la correlación con las comunidades de los oxidadores de amonio (Nicol et al., 2008). Reportes previos sugieren que este podría disminuir hasta en 0.7 unidades posterior a un evento de riego (González-Méndez et al., 2015), o inclusive entre 0.3 y 1.08 unidades en el largo plazo en suelos irrigados con aguas residuales ácidas (Xu et al., 2010). Las mediciones del presente trabajo sugieren por el contrario un incremento gradual en dicho parámetro conforme a la acumulación de los riegos con agua residual, probablemente por las altas concentraciones de Na_2CaCO_3 provenientes del agua de riego (Flores et al., 1997; Pérez-Díaz et al., 2019). Los incrementos en el pH producto de la irrigación con agua residual también se han sugerido en otros estudios (Abd-Elwahed, 2019; Hameeda et al., 2019). Además del Na_2CaCO_3, también se ha observado que el agua residual de la Ciudad de México es rica en Na^+, Cl^-

and HCO_3^- (Aguilar-Rangel et al., 2020), por lo que se convierte en la causa del incremento de la CE. Otros suelos expuestos a aguas residuales también han sufrido una ligera salinización como se observa en los suelos estudiados, principalmente por la constante entrada de iones (Friedel et al., 2000; Lüneberg et al., 2018).

El stock de carbono también se ve alterado por el agua residual, ya que este se incrementa de forma significativa en los suelos irrigados por 50 y 100 años en comparación con los de temporal. Sánchez- González et al. 2017 estudiaron más sitios con diferente tiempo bajo riego y encontraron que los almacenes alcanzan un nuevo estado de equilibrio entre 30 y 40 años. Aunque el pico máximo recae sobre los 50 años de riego por el probable equilibrio entre la mineralización y humificación. El mínimo en los suelos de temporal por otra parte se debe a la pérdida del almacén natural debido al cambio de uso de suelo a agrícola, sin embargo, en los suelos irrigados el suministro proveniente del agua residual y del material vegetal post-cosecha recupera el almacén sin llegar a valores silvestres. Aunque cabe aclarar que dichas prácticas han llevado a un cambio en la calidad de la materia orgánica del sitio, favoreciendo estructuras complejas que son difícilmente aprovechables como la celulosa y la lignina (Sánchez–González et al., 2017). El nitrógeno total por otro lado suele provenir del agua residual, los fertilizantes y en menor proporción de los diazótrofos (Hernández-Martínez et al., 2018). Este al igual que el C se incrementó gradualmente con los riegos alcanzando lo que se podría predecir como una asíntota en los 100 años de riego con agua residual.

El Índice de Toxicidad (IT) es una variable dependiente de la concentración de metales, por lo que actúa como un reportero ambiental de la contaminación de los suelos producto de la irrigación con agua residual. El IT se incrementa lentamente entre los 0 -50 años de riego, sin embargo, éste crece de forma significativa hacia los 100 años. Esto se debe al transporte y entrada de metales desde el agua residual (Siebe, 1995). Esto se ha visto reflejado en otros suelos en contacto con agua de esta calidad por la acumulación de dichos metales (Guédron et al., 2014).

Los cambios anteriores en las características de los suelos estudiados tuvieron una influencia directa e indirecta sobre el establecimiento de las comunidades oxidadoras de amonio. La diversidad de AOA y AOB no sufrió cambios y tampoco tuvo correlación con los parámetros fisicoquímicos con relación a los años irrigados con agua residual. Aunque como se esperaba, la abundancia del gen *amoA* de las AOA tuvo una correlación positiva significativa con el contenido de carbono (en especial orgánico), probablemente por su estilo de vida mixótrofo (Sun et al., 2019). Mientras que, la abundancia de las AOB se correlacionó fuertemente con el pH, el Nt y el IT. El pH tiene una influencia directa, ya que el incremento hacia un ambiente ligeramente alcalino favoreció el establecimiento y crecimiento de esta comunidad sobre las AOA (Nicol et al., 2008). Las altas concentraciones de amonio, así como el incremento en el almacén de N también representan ventajas adaptativas para las AOB, ya que éstas tienen una tolerancia mayor que las AOA a altas concentraciones de los contaminantes (Verhamme et al., 2011). En el caso de los metales, las AOA tienden a ser más sensibles en comparación con las AOB. Estudios previos demostraron que ciertas concentraciones de Zn, Cu, Co, Ni, Cd y hasta Pb podrían tener una correlación positiva con algunas AOB y negativa sobre las AOA (Zhang et al., 2021). Mientras que, altas concentraciones de metales han mostrado un efecto negativo sobre las comunidades AOA, caso contrario a las AOB que tienen cierta resistencia a metales pesados, como se observó con el Cu (50 mg /kg) (Tang et al., 2020). Lo anterior se puede ver reflejado en la razón entre las AOA:AOB, donde esta relación tiene valores más bajos ante perturbaciones. De forma convencional se mantiene la aseveración que las AOA son más abundantes que las AOB en suelos, en relación de hasta más de 50:1 (Huang et al.,

2021). No obstante, en los suelos estudiados bajo la influencia del agua residual se encontró que, si bien ambas aumentan su abundancia, la tasa de crecimiento es mayor en las AOB que en las AOA, por lo que hacia los 100 años de riego la relación es cercana al 1:1 con las AOA.

Así, este estudio propone que los cambios en la comunidad microbiana oxidadora de amonio no se ven reflejados sobre las grandes categorías taxonómicas, sino que el efecto se encuentra a nivel de filotipos. Queda mencionar que la hipótesis planteada donde se espera un decremento en la diversidad de los oxidadores de amonio no sucedió, y más bien, se observó un recambio de filotipos, que sí incrementan su abundancia en los suelos conforme se prolonga el riego con agua residual a lo largo de los años.

10.2 El uso de herramientas metagenómicas brinda una mayor profundidad en la identificación de microorganismos oxidadores de amonio.

Los avances tecnológicos en las últimas décadas han permitido desarrollar nuevas herramientas para el estudio de comunidades microbianas. Una de estas corresponde a la adaptación de técnicas de secuenciación masiva para el análisis directo de todo el material genético presente en una muestra ambiental. Dichas aproximaciones metagenómicas han permitido tener una visión más amplia con relación a la composición y abundancia de una gran variedad de genes, la identificación de nuevas rutas biosintéticas y el descubrimiento de nuevos microorganismos, sin la necesidad del establecimiento de un cultivo de por medio (Daniel, 2005). Esta herramienta significó una revolución desde su implementación ya que desplazó métodos como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y de temperatura (DGGE y TGGE), secuenciación de amplicones o inclusive ensayos involucrados en la determinación de la actividad microbiana (Nkongolo y Narendrula-Kotha, 2020).

Con base en ello, el uso de tecnologías aplicadas al metagenoma de la cronosecuencia permitió la identificación de nuevos grupos tanto arqueanos como bacterianos relacionados con la oxidación de amonio. La primera aproximación partió de la identificación y asignación taxonómica de fragmentos genéticos mediante el clasificador Kaiju, que identifica secuencias codificantes en todos los marcos abiertos de lectura (ORFs) disponibles y lo coteja con una base de datos establecida (Menzel et al., 2016b). Con esta metodología se pudieron identificar secuencias que potencialmente podrían pertenecer a 11 grupos diferentes, en comparación con los 4 grupos encontrados mediante el gen 16S rRNA y los 2 grupos detectados mediante la secuenciación del gen *amoA.* En comparación con las aproximaciones previas se mantienen los grupos *Nitrosocosmicus* y *Nitrososphaera* para ambas aproximaciones, como se espera, al ser estos los dos grupos edáficos de AOA más importantes (Bhardwaj et al., 2023). Aunque en este caso la proporción de *Nitrosocosmicus* es mayor a la detectada previamente sobre todo en suelos irrigados, probablemente por ser tolerante a grandes concentraciones de amonio (Jiang et al., 2023). Aunque otros grupos minoritarios igual tienen representativos, destacando entre ellos *Nitrosopolaris* (0.05%). Este género de distribución típicamente polar suele encontrarse en suelos oligotróficos de la tundra y desiertos polares, aunque igual se han encontrado en suelos de praderas y brezales. Sin embargo, su capacidad de asimilar pequeñas moléculas orgánicas, su potencial ureolítico y su maquinaria enriquecida de genes involucrados en la reparación de DNA le permiten adaptarse a suelos como los del Valle del Mezquital (Pessi et al., 2022).

En el caso de las AOB, *Nitrosospira* y *Nitrosomonas* se mantuvieron como los grupos más abundantes. Sin embargo, en comparación con el análisis previo basado en el gen 16S rRNA no se detectaron grupos con amplia representación como MND1 y Ellin6067, que son

reconocidas como AOB de suelos agrícolas con una gran capacidad de tolerancia a contaminantes como metales (Hargreaves et al., 2015; Wang et al., 2022). No obstante, dos nuevos géneros fueron detectados en una abundancia notable: *Nitrosococcus* y *Nitrosovibrio*. El primer género es dominante en lodos activados, plantas de tratamiento de aguas residuales e inclusive en aguas residuales ricas en amonio, por lo que su presencia en los suelos irrigados es esperada, aunque igual fue detectada en suelos de temporal (Fumasoli et al., 2017; Juretschko et al., 1998). *Nitrosovibrio* por otro lado, parece estar emparentada con *Nitrosospira*, ya que comparten características (Ida et al., 2004). También fue posible detectar de forma más específica especies de *Nitrospira* confirmadas como comammox, algo que no había sido posible con los análisis anteriores.

Además de aportar la taxonomía previa, el usar metagenomas también permite la búsqueda de genes específicos. A partir de la búsqueda del gen *amoA* se pudo hacer una nueva aproximación taxonómica. La detección mediante el gen *amoA* de AOA mantuvo los grupos mayoritarios detectados previamente mediante Kaiju, incluyendo secuencias cuya definición taxonómica aún está pendiente al ser aislados o MAGs. Con base en esos resultados se definió un núcleo conformado por 9 filotipos arqueanos asociados a *Nitrososphaera, Nitrosocosmicus, Nitrosopolaris* y aislados ambientales. Posteriormente, se forma un nuevo núcleo que involucra solo a los suelos irrigados, donde *Nitrosocosmicus* aumenta en cuanto a su abundancia y diversidad en comparación con los suelos de temporal. Este resultado se observó previamente mediante los análisis realizados con Kaiju y la previa secuenciación del gen 16S rRNA, confirmando que *Nitrosocosmicus* juega un papel importante en los suelos irrigados. Como se mencionó anteriormente, las arqueas del género *Nitrosocosmicus* están adaptadas a grandes concentraciones de amonio, pero que además puede ser transportada por el agua residual y tiene un crecimiento óptimo en pH de 7.5, en comparación con otras arqueas cuyo pH óptimo es ligeramente ácido (Xie et al., 2021). De igual forma se sugiere la presencia de *Nitrosopolaris,* sobre todo en suelos irrigados. Lo anterior debe investigarse más a fondo ya que podría representar una adaptación poco conocida de este taxón. *Nitrososphaera* decrece su abundancia y se ve sustituida por AOA no cultivables como se sugería con la asignación taxonómica mediante el gen 16S rRNA y Kaiju. Por lo que es necesario llevar un análisis más profundo para definir taxonómicamente a estas abundantes arqueas.

Mediante el análisis de los genes *amoA* bacterianos se pudieron identificar 4 géneros: *Nitrosospira, Nitrospira, Nitrosomonas* y *Nitrisovibrio*. Dichos taxones se habían identificado previamente mediante los otros tipos de análisis, por lo que queda confirmado que ellos son las AOB que habitan los suelos estudiados del Valle del Mezquital. Basado en la presencia de estos, se identificó un núcleo compartido de 5 filotipos conformado por *Nitrosospira* y *Nitrosovibrio,* dos géneros emparentados filogenéticamente y cuyas respuestas ambientales suelen ser similares (Tang et al., 2021). Particularmente se observó que *Nitrosospira multiformis* y *Nitrosospira briensis* son especies comunes en suelos ligeramente alcalinos y que responden de manera positiva hacia la adición de amonio, por lo que encuentran condiciones óptimas en los suelos estudiados (Liu et al., 2021). Las *Nitrosomonas* encontradas mediante estos análisis están identificadas en grupos aislados de suelos con alta resistencia al amonio, cuyo crecimiento óptimo puede darse en un rango entre 6-8 de pH y que en algunos casos (*N. ureae y N. oligotropha*) pueden tener actividad de ureasa (Kikuchi et al., 2023; Şentürk et al., 2023). Esto justifica su existencia y abundancia en los suelos irrigados con agua residual. Por último, se detectaron secuencias *amoA* correspondientes a un organismo comammox (*Nitrospira* sp. SG-bin1). Esto representa una ventaja, ya que en la actualidad la selección de cebadores encontrados en la literatura tiene limitaciones prácticas, y el conocimiento sobre su diversidad, abundancia y rol funcional en sistemas como el suelo se encuentra limitado (Lin et al., 2020).

Finalmente se compararon las secuencias obtenidas de la secuenciación de amplicones y aquellas completas obtenidas de los metagenomas. Las secuencias de *amoA* arqueano formaron grupos para *Nitrosocosmicus, Nitrososphaera* y Nitrososphaeraceae no definidos, pero que estaban cercanos a *Nitrososphaera*. En general los grupos se mantuvieron en comparación a los obtenidos de la secuenciación de amplicones, con la única diferencia del cambio en la clasificación de alguno de ellos pasando de *Nitrososphaera* a Nitrososphaeraceae. La definición de estos grupos como ambientales es común en estudios metagenómicos, donde la información aportada llega a no definir por completo un taxón (Wu et al., 2021). Sin embargo, la cercanía presente en la topología del árbol sugiere que éstas se encuentran emparentadas filogenéticamente y por lo tanto son taxonómicamente cercanas. Las secuencias obtenidas mediante los metagenomas se incluyeron en los subgrupos previamente establecidos, por lo que pueden considerarse complementarias a las obtenidas por la técnica de amplificación-secuenciación de genes *amoA*.

Las AOB tuvieron un comportamiento diferente, ya que secuencias obtenidas directamente de los metagenomas formaron un subgrupo independiente a lo previamente encontrado en la secuenciación de amplicones. El grupo denotado como Nitrosomonadaceae no tuvo una definición taxonómica especifica a pesar de encontrarse cerca de *Nitrosomonas*. Por lo que podrían tratarse de algún grupo encontrado mediante otra metodología como *Nitrosovibrio* o inclusive secuencias sin una definición taxonómica hasta el momento. *Nitrosomonas* por otro lado fue complementado por una secuencia más lo cual refuerza la presencia y abundancia de este grupo sobre todo en suelos irrigados, pero lo limitante que pueden llegar a ser los cebadores para el gen *amoA* de AOB usados en el presente estudio (Meng et al., 2022). En cuanto a *Nitrosospira* las secuencias encontradas complementaron las previamente obtenidas, justificando una buena cobertura del cebador usado para dicho grupo (Rotthauwe et al., 1997). No fue posible detectar secuencias *amoA* involucradas en comammox por problemas con su cobertura, aunque es necesario mejorar la profundidad de análisis posteriores para determinar en mejor grado la abundancia y diversidad intergénica de estos microorganismos.

La perspectiva metagenómica del presente estudio representó una aproximación acertada que permitió la confirmación de los filotipos detectados por la secuenciación de amplicones, además, dio luz al descubrimiento de otros grupos no detectados previamente, lo cual seguramente está ligado al sesgo generado por los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación. Los filotipos mayoritarios fueron detectados exitosamente, y tienen importancia en el perfil funcional microbiano de los suelos regados con agua residual. Estos resultados de comparación metodológica ayudaron a confirmar el efecto gradual del riego con agua residual sobre los oxidadores de amonio, particularmente sobre algunos grupos y filotipos específicos. Con esto, se verificó la segunda hipótesis de trabajo, donde se menciona que las herramientas metagenómicas ayudan a tener una definición en la identificación y clasificación en grupos oxidadores de amonio.

10.3 Efecto del cambio en la calidad del agua de riego sobre las comunidades oxidadoras de amonio

El Valle del Mezquital ha aprovechado las aguas residuales provenientes de la Ciudad de México por más de 100 años, sobre todo para la transformación del uso de suelo con fines agrícolas. Recientemente, una planta de tratamiento de aguas residuales comenzó a operar en la zona, lo que involucra un cambio de calidad de agua para el riego. Se hipotetizó que el uso del agua de la PTAR acarreará cambios en la comunidad microbiana establecida

en suelos regados por 100 años con agua residual; de una manera similar a como pasó desde el uso de agua residual tuvo sobre la nativa (Lüneberg et al., 2018).

En general, no se observaron cambios significativos entre las columnas regadas con agua residual y agua tratada, ya que mantienen tendencias similares en cuanto al ascenso y descenso de los grupos oxidadores de amonio. Los presentes resultados pueden deberse a diversas circunstancias, entre las que se encuentran: sesgos metodológicos, el establecimiento de las muestras en el invernadero o la propia naturaleza del agua tratada usada para los riegos.

Los problemas iniciales con relación a la metodología radicaron en el establecimiento de las muestras. Los suelos correspondientes al sitio Las Palmas presentan un manejo técnico diferente al de los suelos de Bojayito y Ulapa-Tetepango. El manejo de los suelos de Las Palmas involucra el uso constante de fertilizantes químicos, así como de pesticidas (C. Siebe, comunicación personal). Por lo que las condiciones iniciales de estos suelos pueden ser diferentes a las de los otros suelos estudiados, ya que la acumulación de éstos podría representar un contaminante que podría estar seleccionando a la comunidad microbiana (Walder et al., 2022). Aunado al punto anterior, otro punto a considerar es el cultivo y estadio presente en los suelos estudiados. Estudios previos han demostrado que los estadios de crecimiento vegetal pueden influenciar el establecimiento de la microbiota de suelos agrícolas (Schreiter et al., 2014). Los suelos de Bojayito y Ulapa-Tetepango contenían alfalfa en estadios jóvenes, mientras que, los suelos de Las Palmas presentaban estadios más avanzados (L. Mora, comunicación personal), por lo que su microbiota podría estar adaptada a diferentes condiciones. Por otra parte, el desconocimiento de la estructura del suelo en las columnas es otro factor para tomar en cuenta. Esto se observó en dos columnas de Ulapa-Tetepango, en las que después del desmontaje se pudo observar una estructura del suelo única. En este caso un cúmulo de suelo dominaba la parte central de la columna. Esta estructura podría interferir con el flujo de agua del riego a través de la columna, generando condiciones anóxicas más duraderas. Finalmente, la heterogeneidad de los grupos iniciales puede deberse a que no todas las columnas fueron de forma continua. Lo anterior sumado a la heterogeneidad del suelo puede agregar un sesgo inicial, a partir del cual cada columna tendría un comportamiento singular.

De igual forma, se deben considerar errores metodológicos que fueron cometidos durante el desarrollo del experimento. Uno de ellos fue el establecimiento de las columnas en el invernadero, donde la temperatura no fue constante debido a problemas en las instalaciones. Estas fallas técnicas elevaron la temperatura ambiental en periodos de tiempo correspondientes a días. La temperatura es un factor ambiental primordial en el establecimiento de las comunidades microbianas, especialmente en las relacionadas a la oxidación de amonio (Avrahami et al., 2003). Finalmente, la toma de muestra fue un factor importante que debe ser considerado, ya que las deficiencias en la técnica podrían significar no tomar una muestra significativa de la columna. Esto debido a que solo era posible tomar muestra de la capa más superficial, que es justo donde se podrían acumular las partículas suspendidas de las aguas de riego (tanto en el agua residual y tratada). Por lo que es necesario tener precauciones con relación a la estrategia metodológica en futuros análisis relacionados a este experimento.

Además de los contratiempos metodológicos, las propiedades del agua tratada usada en el presente estudio son primordiales para explicar los resultados obtenidos. El agua catalogada como tratada para los riegos de las columnas no cumplió con lo esperado en cuanto a las características esperadas de esta clase de agua. Esto debido a que el agua tratada proveniente de la planta se mezcla con agua residual no tratada posterior a la salida del efluente. Esta agua mezclada presentó ligeras disminuciones en cuanto a carbono

orgánico disuelto (COD), fluctuando en un rango de 17.5 – 23.2 mg C /L en comparación con el agua residual cuyo rango fue de 22.1 – 41.7 mg C /L. De igual manera no se observaron cambios importantes en cuanto a su pH y CE (Alvarez Olivares, 2023). Aunado a lo anterior, se confirmó una disminución del $N\text{-}NH_4^+$ en el agua de cruda a tratada de 35.9 – 28.3 a 21.8 – 16.4 mg/L respectivamente. Los valores correspondientes al agua tratada se encuentran por debajo de los reportados en el agua residual usada en la zona (26 – 30 mg/L $N\text{-}NH_4^+$) (Hernández-Martínez et al., 2018), pero similares a otras aguas residuales municipales no tratadas (10 – 22 mg/L $N\text{-}NH_4^+$) (Hlavay et al., 1982; Kriška et al., 2018). Por lo que la disminución en la entrada de amonio en el sistema podría no significar una variación considerable para los microorganismos oxidadores de amonio. Esto debido a que estudios previos han calculado que la concentración mínima de amonio para el crecimiento de las AOB es de 1 μM, una concentración muy por debajo de lo encontrado en suelos agrícolas (Bollmann et al., 2002). Con base en lo anterior, se observó que la disminución en la concentración de N y COD del agua de la PTAR no es suficiente para influir de forma repentina en los microorganismos oxidadores de amonio. Por lo que, se espera que los cambios en la estructura de la comunidad oxidadora de amonio podrían verse reflejados en una mayor cantidad de tiempo.

No obstante, los resultados demostraron que existen tendencias que podrían desembocar en probables cambios en la comunidad oxidadora de amonio por efecto del riego con agua tratada. En particular, la estructura de la comunidad oxidadora de amonio bacteriana, que cambió en los suelos de Bojayito y Ulapa-Tetepango. En ambos sitios la abundancia y la presencia de los grupos llevaron a, primero, causar un cambio sobre la comunidad posterior al inicio de los riegos (R0), causada por la caída en la abundancia del grupo MND1. Posteriormente, un cambio gradual se observa en los suelos entre los riegos tempranos (R03-R08) y los riegos tardíos (R12-R18). Sobre todo, con una ligera separación entre los sitios irrigados con agua residual y agua de la planta de tratamiento. Esto puede deberse a las diferencias en la abundancia de *Nitrosospira* en Ulapa-Tetepango, y el del mle1-7, MND1 y *Nitrosomonas* en Bojayito. Un incremento similar de mle1-7 y MND1 se había observado en suelos agrícolas tratados con un biochar generado a 650 ºC, cuya calidad involucraba una menor carga de nitrógeno y fósforo como se espera en los riegos con agua de la planta de tratamiento (Zhao et al., 2023). Mientras que, la caída en la abundancia de *Nitrosospira* puede estar relacionada a la disminución en la entrada de amonio, llevando a una menor actividad oxidadora de amonio y por lo tanto un menor crecimiento (Avrahami y Bohannan, 2007; Taylor y Bottomley, 2006).

Para el caso de la estructura de la comunidad oxidadora de amonio arqueana, ésta cambió posterior al R0 en Bojayito y Ulapa-Tetepango, probablemente por el aumento en la abundancia relativa de *Nitrosocosmicus*. Sin embargo, en los riegos posteriores la diferencia que se observa es pobremente explicada según los gráficos de ordenamiento, revelando un nulo efecto de la calidad del agua sobre las AOA. Aunque el cambio posterior al R0 igualmente pudo deberse al efecto de aclimatación de las AOA al invernadero, desembocando en sesgos en los resultados. Dicho efecto ha sido reportado previamente en diferentes experimentos llevados a cabo en invernaderos (Forero et al., 2019).

Por otro lado, los suelos correspondientes a Las Palmas no presentaron tendencias en los análisis de estructura de la comunidad oxidadora de amonio, tanto arqueana como bacteriana, en comparación con los otros dos sitios estudiados. Esto puede ser atribuido a las características propias de estos sitios, ya que como se observó en Alvarez Olivares (2023) tiene una menor cantidad de C y N, así como un pH más alto. Estos factores son considerados determinantes en la determinación de la abundancia y composición de las AOA y AOB en suelos (Sun et al., 2019; Xiao et al., 2021). Además, es necesario considerar

las diferencias en el manejo agrícola de las parcelas donde fueron tomadas las muestras, ya que este involucra el uso de fertilizantes y pesticidas (Akter et al., 2022). Por lo que el manejo de estos suelos podría ser determinante en el establecimiento de una microbiota diferente a los otros sitios, cuyas propiedades fisicoquímicas son más similares entre sí.

En consenso, los tres suelos estudiados bajo 100 años de riego en la zona del Valle del Mezquital, *Nitrosocosmicus* fue el género de AOA con mayor abundancia. Estos son suelos con una constante entrada de nitrógeno en formas reducidas, por lo cual la amplia mayoría de las AOA se ven afectadas por las concentraciones de amonio alrededor de 10-20 mM (Gao et al., 2016). Sin embargo, la tolerancia de *Nitrosocosmicus* que suele ser comparable a la de las AOB, le permite establecerse como la dominante (Jiang et al., 2023). Las arqueas asociadas a aislados no cultivables fueron el segundo grupo en importancia, por lo que deben tener mecanismos de tolerancia similares a *Nitrosocosmicus.* De forma inesperada, *Nitrososphaera* fue un grupo minoritario a pesar de que se había visto con una mayor abundancia en los suelos de Las Palmas. Aunque dicho resultado es fundamentado solo cuando el gen *amoA* es usado como reportero. Para las AOB, el grupo mayoritario de al iniciar el experimento (R0) en dos de los tres sitios estudiados fue MND1, un grupo bacteriano importante en la oxidación de amonio y fijación de N de suelos agrícolas (Tang et al., 2023). Dicho resultado es congruente con lo visto anteriormente en la cronosecuencia (usando como referencia la asignación taxonómica por el gen 16S rRNA), sobre todo en los suelos con menos años de irrigación. Posteriormente, con el avance en los eventos de riego este grupo se ve sustituido por *Nitrosospira* y *Nitrosomonas,* como se observa en ambos análisis. Estos últimos dos grupos fueron los otros grupos mayoritarios en los suelos de las 3 localidades como se esperaba, al ser las AOB más abundantes en sistemas agrícolas como se describió anteriormente (Taylor y Bottomley, 2006).

La abundancia de los genes *amoA* también fue un indicador del efecto del agua tratada sobre los oxidadores de amonio. Sobre todo, cuando se pone en relación con la comunidad general (cuantificación del gen 16S rRNA). Las AOA de Bojayito y Ulapa-Tetepango aumentaron su abundancia sin importar el tipo de agua que se usó para el riego, como se espera en eventos continuos de irrigación (Yang et al., 2017). Sin embargo, la pendiente de crecimiento es mayor en Ulapa-Tetepango probablemente por las condiciones óptimas, en relación con la entrada constante de N al sistema. La abundancia de las AOA en Las Palmas disminuyó, probablemente por la diminución en la entrada de N por el agua residual, y la insuficiencia del almacén de N para mantener la abundancia de las AOA.

Como se observó con la estructura de la comunidad, las AOB demostraron tener mayor sensibilidad al cambio en la calidad del agua de riego. La abundancia de las AOB de Ulapa-Tetepango disminuyó en relación con la comunidad total en los suelos irrigados con agua tratada. Mientras que en el caso de Las Palmas la tasa del aumento de abundancia en relación con la comunidad fue menor en comparación a la calculada de suelos irrigados con agua residual. En ambos casos, la diminución en la entrada de amonio al sistema pudo tener un efecto sobre la abundancia de sus AOB (Ouyang et al., 2016). De igual forma, el agua residual suelo tiende a incrementar el pH del suelo, impactando sobre la abundancia de las AOB, como se observa en todos los sitios (Zhang et al., 2012).

De igual manera, la razón de AOA/AOB es un indicador del efecto en el cambio de las características del suelo. En Bojayito y Las Palmas la relación disminuyó independientemente del tipo de agua usada para el riego, indicando una mejor adaptación bacteriana al cambio de la calidad de agua de riego (Ouyang et al., 2017). Mientras que, en Ulapa-Tetepango el agua tratada tuvo un efecto negativo sobre las AOB, pero no sobre las AOA, elevando la razón casi tres veces más. Así, el crecimiento de las AOA y AOB en riego

con agua residual no conllevó a cambios en su relación, seguramente por el equilibrio en los niveles de C y N.

Cambios en el almacén de C y N son el mayor efecto que puede llegar a tener el uso de agua tratada sobre el agua residual en los suelos agrícolas. Los cambios en ambos almacenes de igual forma influyen de forma específica sobre los microorganismos oxidadores de amonio. Para las AOA, las muestras correspondientes al R0 de Bojayito y Ulapa-Tetepango se correlacionaron de forma significativa con el Ct, ya que en este punto se encontró la mayor concentración de este. Lo anterior se pudo observar en suelos fertilizados mediante NPK, donde el carbono de los suelos se correlacionaba significativamente con las AOA (Li et al., 2019). En Bojayito las muestras correspondientes al R18 con agua residual, se correlacionaron más fuerte con el Nt, ya que fueron las muestras donde en promedio el Nt aumentó. Dicha asociación se ve correlacionada con el aumento en la abundancia relativa de *Nitrosocosmicus,* una agrupación de AOA con alta resistencia al amonio (la principal especie introducida por el agua residual) (Lehtovirta-Morley et al., 2016). En Ulapa-Tetepango el Nt se asoció solo con una muestra irrigada con agua residual en el R18. Esta asociación puede deberse al incremento súbito de las AOA hacia el R18 con WW y del taxón *Nitrosocosmicus*, producto de la entrada continua de nitrógeno al sistema (Jiang et al., 2023).

Un efecto similar se pudo observar en la correlación de las AOB con el contenido de C y N en ambos sitios. Los suelos de Bojayito presentaron una separación en dos agrupaciones en el R18, una para la comunidad de AOB de las columnas irrigadas con WW y otra para las irrigadas con TW. El Nt en este caso se asoció de forma significante con las irrigadas con WW, probablemente por su mayor aporte de nitrógeno en comparación con la TW (Sun et al., 2019). En Ulapa-Tetepango la asociación del Nt con las AOB fue significante con las muestras del R0, ya que en este caso era donde había una mayor concentración de nitrógeno. Esto puede deberse al funcionamiento óptimo de las AOB a mayores concentraciones de nitrógeno en los suelos (Ouyang et al., 2017). En Las Palmas, tanto para AOA y AOB no hubo agrupaciones bien definidas. Aunque, en ambos casos tanto Ct y Nt estuvieron más correlacionadas a los sitios del R18 ya que se observó un incremento en el almacén de N y C.

11 Modelo conceptual

La oxidación de amonio fue confirmada en los suelos agrícolas estudiados mediante sondas moleculares, aunque con diferencias tangibles entre ellos. Particularmente, estos cambios fueron detectados en la composición de la comunidad, así como en su abundancia. Esto se debe a que la comunidad microbiana oxidadora de amonio se caracteriza por responder a estímulos ambientales como cambios en las características fisicoquímicas del sistema que habitan.

Los resultados del presente estudio permitieron entender el efecto que tiene el tipo de agua de riego sobre estos microorganismos en suelos agrícolas (**Fig. 36**). Los suelos de temporal suelen recibir una cantidad limitada de nutrientes, que aunado a las prácticas agrícolas han llevado a una disminución en su almacén de carbono y nitrógeno. En ello se ve reflejada la abundancia microbiana y en específico de oxidadores de amonio en comparación con los suelos que fueron irrigados. Dichas deficiencias representan una ventaja para las AOA por su capacidad captadora de amonio, definiéndolas como un grupo mayoritario de oxidadores de amonio. De igual forma su diversidad se ve restringida en general a dos grupos de AOA como *Nitrososphaera* y *Nitrosopolaris*, así como uno de AOB que es *Nitrosospira*.

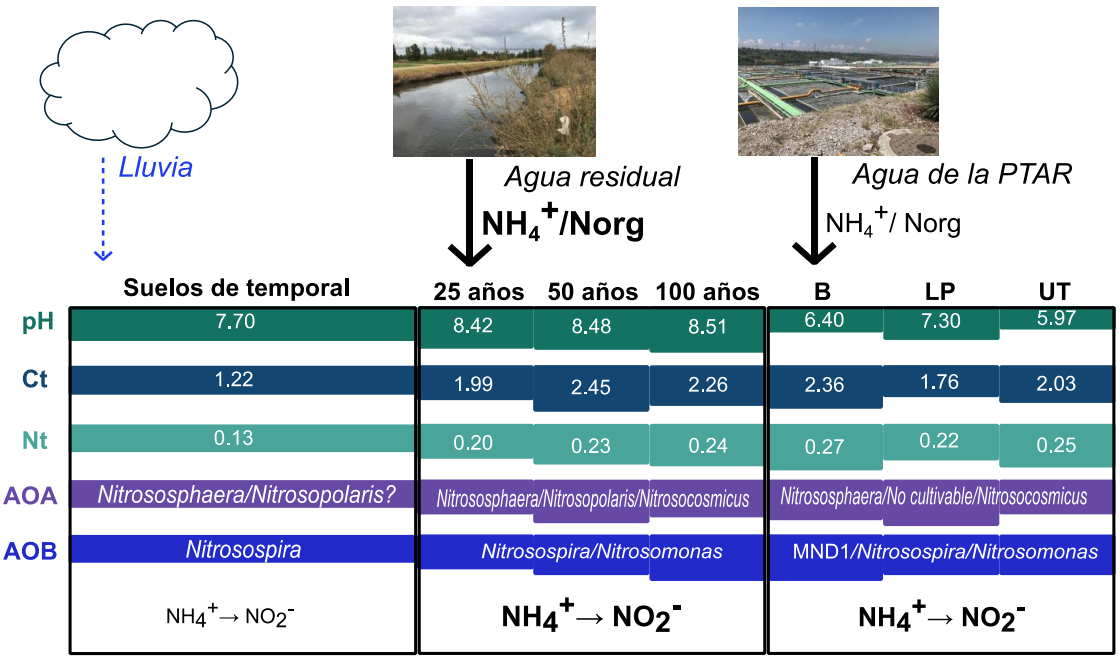

Figura 36. Modelo conceptual de la influencia del agua usada en el riego sobre la estructura, composición y abundancia de los microorganismos oxidadores de amonio.

Los suelos que han sido regados con agua residual, por otra parte, tienen una entrada constante de nitrógeno en forma orgánica y reducida (amonio), y de carbono. Este manejo ha permitido el incremento gradual en la abundancia de los oxidadores de amonio en general en relación con los años de riego. Además, fueron detectados otros grupos como

Nitrosocosmicus (AOA) y *Nitrosomonas* (AOB) que no habían sido encontrados en los suelos de temporal. Esto representa la mayor abundancia en comparación con los otros manejos. De igual forma se incrementó el pH y la CE, así como la concentración de contaminantes como metales. Lo anterior se correlacionó con un aumento en mayor proporción de AOB en comparación de AOA.

Los suelos irrigados con agua de la PTAR tuvieron una respuesta diferente en comparación con aquellos que se mantuvieron bajo la irrigación con agua residual cruda. Si bien estos son suelos que han sido irrigados por 100 años con aguas residuales, el uso del agua reclamada ha llevado a una ligera diminución en el almacén de carbono, pero no así en el de nitrógeno. Bajo estas condiciones, *Nitrosocosmicus* aumentó su abundancia relativa en el caso de las AOA. Mientras que, en las AOB, MND1 pasó de ser el grupo mayoritario inicial, a ser desplazado por *Nitrosospira* conforme se acumulan los riegos con agua reclamada. Sin embargo, el efecto sobre la abundancia absoluta fue específico para cada sitio. En Bojayito, la abundancia de los oxidadores de amonio aumentó uniformemente. En Las Palmas por otro lado la abundancia de las AOB aumentó y la de las AOA disminuyó, mientras que, en Ulapa-Tetepango tuvo un efecto contrario incrementando las AOA y disminuyendo las AOB. Estos resultados sin embargo pueden tener errores en relación con el muestreo, por lo que es necesario llevar a cabo nuevos experimentos sobre suelos homogenizados y por una mayor cantidad de tiempo, así como usar agua que provenga directamente de la PTAR.

En general se observó que la comunidad oxidadora de amonio responde de forma específica a los cambios generados a largo plazo por el uso de agua residual en los suelos agrícolas. En particular se observó que la abundancia de esta comunidad es mayor en los campos irrigados con agua residual cruda, seguidos por los irrigados con agua tratada y finalmente los de temporal. *Nitrososphaera* (AOA) y *Nitrosospira* (AOB) estuvieron presentes en todos los sitios estudiados, y probablemente *Nitrosopolaris.* Sin embargo, *Nitrosocosmicus* (AOA) y *Nitrosomonas* (AOB) fueron detectadas en suelos irrigados con agua residual, pudiendo resultar en un indicador para este tipo de prácticas.

12 Conclusiones

En el presente trabajo se analizó el aumento en la abundancia de los grupos nitrificadores a partir de su proceso determinante: la oxidación de amonio. El análisis se llevó a desde tres perspectivas para la identificación de oxidadores de amonio: mediante la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, y del gen *amoA,* y del uso herramientas metagenómicas. A partir de ellas, se encontró que el agua residual ha tenido un efecto gradual sobre la comunidad oxidadora de amonio, en cuanto a composición y abundancia. Así mismo, se investigó la posible influencia del cambio en la calidad de agua de riego sobre todo en la abundancia de las AOB.

Usando una cronosecuencia de suelos regados por diferentes periodos de tiempo con agua residual, se observó que el uso de agua residual para irrigar suelos agrícolas se correlaciona con cambios en la comunidad oxidadora de amonio. Contrario a lo planteado en la primera hipótesis, no fueron detectados cambios significativos en la diversidad en los microorganismos oxidadores de amonio en relación con los años de riego. No obstante, se encontraron cambios sobre la estructura de la comunidad, que se ve reflejado en la detección de nuevos grupos en los suelos irrigados como *Nitrosococsmicus* y *Nitrosomonas*. De igual manera se observó un incremento gradual en la abundancia relativa y absoluta de los oxidadores de amonio, confirmando la hipótesis inicial de trabajo. Estos cambios se atribuyeron al incremento gradual de pH, del almacén de C y N, así como la acumulación de contaminantes como los metales.

En línea con la segunda hipótesis, se detectó la presencia de grupos de AOA y AOB que no habían sido detectados mediante la secuenciación de amplicones. Entre los grupos destaca la presencia de AOA y AOB asociados con microorganismos no cultivables. De igual forma destacó la presencia de arqueas asociados a *Nitrosopolaris,* un género no esperado y del que es necesario profundizar en futuros estudios. Sin embargo, fue posible obtener secuencias del gen *amoA* provenientes de los metagenomas que respaldan los hallazgos provenientes de la secuenciación de amplicones. Con lo anterior, podemos asegurar que los metagenomas permitieron una mayor profundidad en el estudio de los microorganismos oxidadores de amonio, particularmente en aquellos no detectados por sesgos en la sonda molecular usada.

Finalmente, con relación a la tercera hipótesis propuesta en el presente estudio, se observó que el uso del agua de la PTAR-A no ocasiona cambios significativos en la comunidad oxidadora de amonio de suelos irrigados con agua residual en el corto plazo. Sin embargo, fue posible observar tendencias como cambios lentos y graduales sobre la estructura de la comunidad oxidadora de amonio bacteriana. De igual manera se pudieron observar cambios en la abundancia absoluta del gen *amoA*. De forma específica en las AOB, donde se puede apreciar en mayor grado la influencia de la calidad del agua, y puede llegar a ser inclusive contrastante. Aunque es necesario llevar a cabo análisis durante periodos de tiempo más largos y con un agua tratada que sea significativamente diferente al agua usada en el presente estudio.

En general, lo anterior corrobora que la calidad del agua usada para el riego de suelos agrícolas influenció el perfil funcional microbiano, en particular el relacionado con la oxidación de amonio. Dichos efectos se ven reflejados en la composición de la comunidad, así como en su abundancia. Sin embargo, es necesario profundizar en otros mecanismos involucrados en el ciclaje del nitrógeno, o inclusive en otros ciclos biogeoquímicos.

13 Perspectivas

Los suelos del Valle del Mezquital, Hidalgo, regados con aguas residuales mostraron tener un gran potencial oxidador de amonio, así como una comunidad definida seleccionada por los cambios en las propiedades fisicoquímicas producto del riego.

Es necesario evaluar de forma individual el efecto que pueden llegar a tener los metales presentes en los suelos sobre los oxidadores de amonio, ya que muchos de estos pueden no ser tóxicos, al ser micronutrientes o formar parte de enzimas como cofactores. De igual forma, se pueden agregar otros metales no considerados en el presente estudio.

Se deberá evaluar de forma individual la relación que existe entre diferentes contaminantes (incluyendo metales) con la comunidad oxidadora de amonio. De igual forma incluir suelos con menos de 25 años de riego con agua residual, para reconocer el efecto del agua residual en plazos de tiempo más cortos. Asimismo, incluir otros tipos de suelos del Valle del Mezquital que de igual forma hayan sido regados con agua residual. Esto ayudaría a entender la influencia del tipo de suelo sumada a la práctica de riego con agua residual sobre la comunidad oxidadora de amonio.

Nitrososphaera y *Nitrosocosmicus* fueron los grupos arqueanos, y *Nitrosospira* y *Nitrosomonas* los bacterianos preponderantes detectados mediante tres perspectivas metodológicas diferentes. Sin embargo, por las técnicas usadas en el presente de igual manera identificaron marcadores moleculares asociados a *Nitrosopolaris*, una AOA que no es común en estos sitios. Por lo que es necesario un estudio que pueda definir de mejor manera este taxón. De igual manera, gran parte de las secuencias fueron asociadas con organismos oxidadores de amonio sin una definición taxonómica hasta el momento, por lo que es necesario ahondar en estos grupos para posteriormente definirlos como probables marcadores moleculares de estos suelos. De igual manera fueron identificados potenciales grupos comammox (*Nitrospira*) que pueden llegar a representar una nueva perspectiva en este estudio, por lo que es necesario su identificación. Aunque por la dificultad en su cultivo, se podría llevar a cabo un enriquecimiento de estos grupos acompañado de un análisis con enfoque metagenómico podría ser un acercamiento óptimo para su definición taxonómica y su contenido genómico.

Además, es necesario evaluar la oxidación de nitrito que corresponde al segundo bloque en la ruta nitrificadora, para tener una perspectiva global del proceso. Como también complementarse con procesos asociados al ciclaje de nitrógeno que han sido reportados previamente como la desnitrificación o anammox. Lo anterior puede realizarse siguiendo un protocolo similar al establecido en el presente estudio, solo acoplándolo a las sondas moleculares propias de cada ruta.

Finalmente, es necesario llevar a cabo análisis que puedan cuantificar el potencial activo, particularmente enfocado en transcritos o la propia actividad enzimática. Esto para evaluar de forma más precisa el efecto del manejo en relación con el agua de riego sobre la actividad oxidadora de amonio.

14 Referencias

Abbas, T., Zhang, Q., Jin, H., Li, Y., Liang, Y., Di, H., & Zhao, Y. (2019). Anammox microbial community and activity changes in response to water and dissolved oxygen managements in a paddy-wheat soil of Southern China. *Science of The Total Environment*, *672*, 305–313. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.392

Abd El-Ghani, M. M., Huerta-Martínez, F. M., Hongyan, L., & Qureshi, R. (2017). The Deserts of Mexico. In *Plant Responses to Hyperarid Desert Environments* (pp. 473–501). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59135-3_9

Abd-Elwahed, M. S. (2019). Effect of long-term wastewater irrigation on the quality of alluvial soil for agricultural sustainability. *Annals of Agricultural Sciences*, *64*(2), 151–160. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2019.10.003

Abegunrin, T. P., Awe, G. O., Idowu, D. O., & Adejumobi, M. A. (2016). Impact of wastewater irrigation on soil physico-chemical properties, growth and water use pattern of two indigenous vegetables in southwest Nigeria. *CATENA*, *139*, 167–178. https://doi.org/10.1016/j.catena.2015.12.014

Aguiar Jr., T. R., Rasera, K., Parron, L. M., Brito, A. G., & Ferreira, M. T. (2015). Nutrient removal effectiveness by riparian buffer zones in rural temperate watersheds: The impact of no-till crops practices. *Agricultural Water Management*, *149*, 74–80. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.10.031

Aguilar-Rangel, E. J., Prado, B. L., Vásquez-Murrieta, M. S., los Santos, P. E., Siebe, C., Falcón, L. I., Santillán, J., & Alcántara-Hernández, R. J. (2020). Temporal analysis of the microbial communities in a nitrate-contaminated aquifer and the co-occurrence of anammox, n-damo and nitrous-oxide reducing bacteria. *Journal of Contaminant Hydrology*, *234*, 103657. https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2020.103657

akter, R., Mukhles, M. B., Rahman, M. M., Rana, M. R., Huda, N., Ferdous, J., Rahman, F., Rafi, M. H., & Biswas, S. K. (2022). Effect of pesticides on nitrification activity and its interaction with chemical fertilizer and manure in long-term paddy soils. *Chemosphere*, *304*, 135379. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135379

Alexander, M. (2015). *Nitrification* (pp. 307–343). https://doi.org/10.2134/agronmonogr10.c8

Alkorta, I., Amezaga, I., Albizu, I., Aizpurua, A., Onaindia, M., Buchner, V., & Garbisu, C. (2003). Molecular Microbial Biodiversity Assessment: A Biological Indicator of Soil Health. *Reviews on Environmental Health*, *18*(2). https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.2.131

Alteio, L. V., Schulz, F., Seshadri, R., Varghese, N., Rodriguez-Reillo, W., Ryan, E., Goudeau, D., Eichorst, S. A., Malmstrom, R. R., Bowers, R. M., Katz, L. A., Blanchard, J. L., & Woyke, T. (2020). Complementary Metagenomic Approaches Improve Reconstruction of Microbial Diversity in a Forest Soil. *MSystems*, *5*(2). https://doi.org/10.1128/mSystems.00768-19

Alvarez Olivares, M. (2023). *Movilidad de fármacos asociados al tratamiento de la enfermedad COVID en suelo regado con agua residual*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Alves, L. de F., Westmann, C. A., Lovate, G. L., de Siqueira, G. M. V., Borelli, T. C., & Guazzaroni, M.-E. (2018). Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science. *International Journal of Genomics*, *2018*, 1–15. https://doi.org/10.1155/2018/2312987

Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, *7*(10), e08093. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093

Avrahami, S., & Bohannan, B. J. M. (2007). Response of *Nitrosospira* sp. Strain AF-Like Ammonia Oxidizers to Changes in Temperature, Soil Moisture Content, and Fertilizer Concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(4), 1166–1173. https://doi.org/10.1128/AEM.01803-06

Avrahami, S., Liesack, W., & Conrad, R. (2003). Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology*, *5*(8), 691–705. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00457.x

Azarbad, H., Niklińska, M., van Gestel, C. A. M., van Straalen, N. M., Röling, W. F. M., & Laskowski, R. (2013). Microbial community structure and functioning along metal pollution gradients. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(9), 1992–2002. https://doi.org/10.1002/etc.2269

Banwart, S. A., Nikolaidis, N. P., Zhu, Y.-G., Peacock, C. L., & Sparks, D. L. (2019). Soil Functions: Connecting Earth's Critical Zone. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, *47*(1), 333–359. https://doi.org/10.1146/annurev-earth-063016-020544

Becerra-Castro, C., Lopes, A. R., Vaz-Moreira, I., Silva, E. F., Manaia, C. M., & Nunes, O. C. (2015). Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environment International*, *75*, 117–135. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.001

Beeckman, F., Motte, H., & Beeckman, T. (2018). Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology*, *50*, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.014

Bhardwaj, L., Reddy, B., & Dubey, S. K. (2023). Deciphering insights into rhizospheric microbial community and soil parameters under the influence of herbicides in zero-tillage tropical rice-agroecosystem. *Environmental Research*, *237*, 117033. https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117033

Bollmann, A., Bär-Gilissen, M.-J., & Laanbroek, H. J. (2002). Growth at Low Ammonium Concentrations and Starvation Response as Potential Factors Involved in Niche Differentiation among Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(10), 4751–4757. https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4751-4757.2002

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., … Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9

Borucki, W. J., & Chameides, W. L. (1984). Lightning: Estimates of the rates of energy dissipation and nitrogen fixation. *Reviews of Geophysics*, *22*(4), 363–372. https://doi.org/10.1029/RG022i004p00363

Broszat, M., Nacke, H., Blasi, R., Siebe, C., Huebner, J., Daniel, R., & Grohmann, E. (2014). Wastewater Irrigation Increases the Abundance of Potentially Harmful Gammaproteobacteria in Soils in Mezquital Valley, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(17), 5282–5291. https://doi.org/10.1128/AEM.01295-14

Brown, M. R., Baptista, J. C., Lunn, M., Swan, D. L., Smith, S. J., Davenport, R. J., Allen, B. D., Sloan, W. T., & Curtis, T. P. (2019). Coupled virus - bacteria interactions and ecosystem function in an engineered microbial system. *Water Research*, *152*, 264–273. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.003

Cajuste, L. J., Carrillo, R. G., Cota, E. G., & Laird, R. J. (1991). The distribution of metals from wastewater in the Mexican Valley of Mezquital. *Water, Air, and Soil Pollution*, *57–58*(1), 763–771. https://doi.org/10.1007/BF00282940

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

Campos, J. L., Garrido, J. M., Méndez, R., & Lema, J. M. (2001). Effect of Two Broad-Spectrum Antibiotics on Activity and Stability of Continuous Nitrifying System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *95*(1), 01–10. https://doi.org/10.1385/ABAB:95:1:01

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, *6*(8), 1621–1624. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8

Caranto, J. D., & Lancaster, K. M. (2017). Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(31), 8217–8222. https://doi.org/10.1073/pnas.1704504114

Carrillo, M., Siebe, C., Dalkmann, P., & Siemens, J. (2016). Competitive sorption of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) surfactants and the antibiotics sulfamethoxazole and ciprofloxacin in wastewater-irrigated soils of the Mezquital Valley, Mexico. *Journal of Soils and Sediments*, *16*(9), 2186–2194. https://doi.org/10.1007/s11368-016-1418-1

Castro, H. F., Classen, A. T., Austin, E. E., Norby, R. J., & Schadt, C. W. (2010). Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(4), 999–1007. https://doi.org/10.1128/AEM.02874-09

Changey, F., Blaud, A., Pando, A., Herrmann, A. M., & Lerch, T. Z. (2021). Monitoring soil microbial communities using molecular tools: <scp>DNA</scp> extraction methods may offset long-term management effects. *European Journal of Soil Science*, *72*(2), 1026–1041. https://doi.org/10.1111/ejss.13026

Chávez, A., Maya, C., Gibson, R., & Jiménez, B. (2011). The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environmental Pollution*, *159*(5), 1354–1362. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.008

Chen, X., Zhang, L.-M., Shen, J.-P., Wei, W.-X., & He, J.-Z. (2011). Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, *47*(3), 323–331. https://doi.org/10.1007/s00374-011-0542-8

Chen, Z., Wu, W., Shao, X., Li, L., Guo, Y., & Ding, G. (2015). Shifts in Abundance and Diversity of Soil Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea Associated with Land Restoration in a Semi-Arid Ecosystem. *PLOS ONE*, *10*(7), e0132879. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132879

Chitsaz, N., & Azarnivand, A. (2017). Water Scarcity Management in Arid Regions Based on an Extended Multiple Criteria Technique. *Water Resources Management*, *31*(1), 233–250. https://doi.org/10.1007/s11269-016-1521-5

Choi, J., Kotay, S. M., & Goel, R. (2010). Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in Nitrosospira multiformis 25196- an ammonia oxidizing bacteria. *Water Research*, *44*(15), 4550–4558. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.040

Cholet, F., Lisik, A., Agogué, H., Ijaz, U. Z., Pineau, P., Lachaussée, N., & Smith, C. J. (2022). Ecological Observations Based on Functional Gene Sequencing Are Sensitive to the Amplicon Processing Method. *MSphere*, *7*(4). https://doi.org/10.1128/msphere.00324-22

Cifuentes, E., Blumenthal, U., Ruiz-Palacios, G., Bennett, S., & Quigley, M. (2000). Health risk in agricultural villages practicing wastewater irrigation in central Mexico: perspectives for protection. *Schriftenreihe Des Vereins Fur Wasser-, Boden- Und Lufthygiene*, *105*, 249–256.

Clark, I. M., Hughes, D. J., Fu, Q., Abadie, M., & Hirsch, P. R. (2021). Metagenomic approaches reveal differences in genetic diversity and relative abundance of nitrifying bacteria and archaea in contrasting soils. *Scientific Reports*, *11*(1), 15905. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95100-9

Contreras, J. D., Meza, R., Siebe, C., Rodríguez-Dozal, S., López-Vidal, Y. A., Castillo-Rojas, G., Amieva, R. I., Solano-Gálvez, S. G., Mazari-Hiriart, M., Silva-Magaña, M. A., Vázquez-Salvador, N., Rosas Pérez, I., Martínez Romero, L., Salinas Cortez, E., Riojas-Rodríguez, H., & Eisenberg, J. N. S. (2017). Health risks from exposure to untreated wastewater used for irrigation in the Mezquital Valley, Mexico: A 25-year update. *Water Research*, *123*, 834–850. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.058

Costa, E., Pérez, J., & Kreft, J.-U. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology*, *14*(5), 213–219. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.006

Costantini, E. A. C., & Mocali, S. (2022). Soil health, soil genetic horizons and biodiversity [#]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *185*(1), 24–34. https://doi.org/10.1002/jpln.202100437

Courty, P.-E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M.-P., Uroz, S., & Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 679–698. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.006

Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., & Wittwer, P. (2005). Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends in Biotechnology*, *23*(6), 321–329. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.001

Crawford, J., Harris, J., Ritz, K., & Young, I. (2005). Towards an evolutionary ecology of life in soil. *Trends in Ecology & Evolution*, *20*(2), 81–87. https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.11.014

Curtis, T. P., Sloan, W. T., & Scannell, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(16), 10494–10499. https://doi.org/10.1073/pnas.142680199

Custódio, V., Gonin, M., Stabl, G., Bakhoum, N., Oliveira, M. M., Gutjahr, C., & Castrillo, G. (2022). Sculpting the soil microbiota. *The Plant Journal*, *109*(3), 508–522. https://doi.org/10.1111/tpj.15568

Dahlin, S., Witter, E., Mårtensson, A., Turner, A., & Bååth, E. (1997). Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry*, *29*(9–10), 1405–1415. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00048-5

Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, *528*(7583), 504–509. https://doi.org/10.1038/nature16461

Dalkmann, P., Broszat, M., Siebe, C., Willaschek, E., Sakinc, T., Huebner, J., Amelung, W., Grohmann, E., & Siemens, J. (2012). Accumulation of Pharmaceuticals, Enterococcus, and Resistance Genes in Soils Irrigated with Wastewater for Zero to 100 Years in Central Mexico. *PLoS ONE*, *7*(9), e45397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045397

Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(6), 470–478. https://doi.org/10.1038/nrmicro1160

Darrah, P. R., Nye, P. H., & White, R. E. (1987). The effect of high solute concentrations on nitrification rates in soil. *Plant and Soil*, *97*(1), 37–45. https://doi.org/10.1007/BF02149821

Della-Negra, O., Camotti Bastos, M., Bru-Adan, V., Santa-Catalina, G., Ait-Mouheb, N., Chiron, S., Heran, M., Wéry, N., & Patureau, D. (2024). Role of endogenous soil microorganisms in controlling antimicrobial resistance after the exposure to treated wastewater. *Science of The Total Environment*, *931*, 172977. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172977

Demko, A. M., Patin, N. V., & Jensen, P. R. (2021). Microbial diversity in tropical marine sediments assessed using culture-dependent and culture-independent techniques. *Environmental Microbiology*, *23*(11), 6859–6875. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15798

DeVries, S. L., & Zhang, P. (2016). Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review. *Current Pollution Reports*, *2*(1), 51–67. https://doi.org/10.1007/s40726-016-0027-3

Downs, T. J., Cifuentes-García, E., & Suffet, I. M. (1999). Risk screening for exposure to groundwater pollution in a wastewater irrigation district of the Mexico City region. *Environmental Health Perspectives*, *107*(7), 553–561. https://doi.org/10.1289/ehp.99107553

Duong, K., & Saphores, J. M. (2015). Obstacles to wastewater reuse: an overview. *WIREs Water*, *2*(3), 199–214. https://doi.org/10.1002/wat2.1074

Durán-Álvarez, J. C., Jiménez, B., Rodríguez-Varela, M., & Prado, B. (2021). The Mezquital Valley from the perspective of the new Dryland Development Paradigm (DDP): present and future challenges to achieve sustainable development. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, *48*, 139–150. https://doi.org/10.1016/j.cosust.2021.01.005

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, *5*(1), 113. https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113

El Ayni, F., Cherif, S., Jrad, A., & Trabelsi-Ayadi, M. (2011). Impact of Treated Wastewater Reuse on Agriculture and Aquifer Recharge in a Coastal Area: Korba Case Study.

Water Resources Management, *25*(9), 2251–2265. https://doi.org/10.1007/s11269-011-9805-2

Elling, F. J., Evans, T. W., Nathan, V., Hemingway, J. D., Kharbush, J. J., Bayer, B., Spieck, E., Husain, F., Summons, R. E., & Pearson, A. (2022). Marine and terrestrial nitrifying bacteria are sources of diverse bacteriohopanepolyols. *Geobiology*, *20*(3), 399–420. https://doi.org/10.1111/gbi.12484

Falkengren-Grerup, U., Brink, D.-J. ten, & Brunet, J. (2006). Land use effects on soil N, P, C and pH persist over 40–80 years of forest growth on agricultural soils. *Forest Ecology and Management*, *225*(1–3), 74–81. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.12.027

Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science*, *320*(5879), 1034–1039. https://doi.org/10.1126/science.1153213

FAO. (2021). *The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture – Systems at breaking point (SOLAW 2021)* (1st ed.). FAO. https://doi.org/10.4060/cb7654en

Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(7), 4117–4120. https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005

Flores, L., Blas, G., Hernández, G., & Alcalá, R. (1997). Distribution and sequential extraction of some heavy metals from soils irrigated with wastewater from Mexico city. *Water, Air, and Soil Pollution*, *98*(1–2), 105–117. https://doi.org/10.1007/BF02128652

Forero, L. E., Grenzer, J., Heinze, J., Schittko, C., & Kulmatiski, A. (2019). Greenhouse- and Field-Measured Plant-Soil Feedbacks Are Not Correlated. *Frontiers in Environmental Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00184

Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., & Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(41), 14683–14688. https://doi.org/10.1073/pnas.0506625102

Friedel, J. K., Langer, T., Siebe, C., & Stahr, K. (2000). Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. *Biology and Fertility of Soils*, *31*(5), 414–421. https://doi.org/10.1007/s003749900188

Fumasoli, A., Bürgmann, H., Weissbrodt, D. G., Wells, G. F., Beck, K., Mohn, J., Morgenroth, E., & Udert, K. M. (2017). Growth of *Nitrosococcus* -Related Ammonia Oxidizing Bacteria Coincides with Extremely Low pH Values in Wastewater with High Ammonia Content. *Environmental Science & Technology*, *51*(12), 6857–6866. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00392

Gao, J., Fan, X., Wu, G., Li, T., & Pan, K. (2016). Changes of abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in three nitrifying bioreactors with different ammonia concentrations. *Desalination and Water Treatment*, *57*(45), 21463–21475. https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1123196

García-Salamanca, A., Molina-Henares, M. A., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2013). Bacterial diversity in the rhizosphere of

maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial Biotechnology*, *6*(1), 36–44. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00358.x

García-Sánchez, M., & Güereca, L. P. (2019). Environmental and social life cycle assessment of urban water systems: The case of Mexico City. *Science of The Total Environment*, *693*, 133464. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.270

Gatica, J., & Cytryn, E. (2013). Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(6), 3529–3538. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1505-4

Gilbert, J. A., Jansson, J. K., & Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology*, *12*(1), 69. https://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1

González-Méndez, B., Webster, R., Fiedler, S., Loza-Reyes, E., Hernández, J. M., Ruíz-Suárez, L. G., & Siebe, C. (2015). Short-term emissions of CO 2 and N 2 O in response to periodic flood irrigation with waste water in the Mezquital Valley of Mexico. *Atmospheric Environment*, *101*, 116–124. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.10.048

Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(2), 221–224. https://doi.org/10.1093/molbev/msp259

Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, *451*(7176), 293–296. https://doi.org/10.1038/nature06592

Gubry-Rangin, C., Hai, B., Quince, C., Engel, M., Thomson, B. C., James, P., Schloter, M., Griffiths, R. I., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2011). Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(52), 21206–21211. https://doi.org/10.1073/pnas.1109000108

Guédron, S., Duwig, C., Prado, B. L., Point, D., Flores, M. G., & Siebe, C. (2014). (Methyl)Mercury, Arsenic, and Lead Contamination of the World's Largest Wastewater Irrigation System: the Mezquital Valley (Hidalgo State—Mexico). *Water, Air, & Soil Pollution*, *225*(8), 2045. https://doi.org/10.1007/s11270-014-2045-3

Guo, G.-X., Deng, H., Qiao, M., Yao, H.-Y., & Zhu, Y.-G. (2013). Effect of Long-Term Wastewater Irrigation on Potential Denitrification and Denitrifying Communities in Soils at the Watershed Scale. *Environmental Science & Technology*, *47*(7), 3105–3113. https://doi.org/10.1021/es304714a

Gupta, A., Singh, U. B., Sahu, P. K., Paul, S., Kumar, A., Malviya, D., Singh, S., Kuppusamy, P., Singh, P., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., Manna, M. C., Crusberg, T. C., Kumar, A., & Saxena, A. K. (2022). Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(5), 3141. https://doi.org/10.3390/ijerph19053141

Habteselassie, M. Y., Xu, L., & Norton, J. M. (2013). Ammonia-oxidizer communities in an agricultural soil treated with contrasting nitrogen sources. *Frontiers in Microbiology*, *4*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00326

Hameeda, Gul, S., Bano, G., Manzoor, M., Chandio, T. A., & Awan, A. A. (2019). Biochar and manure influences tomato fruit yield, heavy metal accumulation and concentration of soil nutrients under wastewater irrigation in arid climatic conditions. *Cogent Food & Agriculture*, *5*(1), 1576406. https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1576406

Hargreaves, S. K., Williams, R. J., & Hofmockel, K. S. (2015). Environmental Filtering of Microbial Communities in Agricultural Soil Shifts with Crop Growth. *PLOS ONE*, *10*(7), e0134345. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134345

Hartemink, A. E., Zhang, Y., Bockheim, J. G., Curi, N., Silva, S. H. G., Grauer-Gray, J., Lowe, D. J., & Krasilnikov, P. (2020). *Soil horizon variation: A review* (pp. 125–185). https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.10.003

Hatzenpichler, R. (2012). Diversity, Physiology, and Niche Differentiation of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(21), 7501–7510. https://doi.org/10.1128/AEM.01960-12

Hernández-Martínez, J. L., Prado, B., Cayetano-Salazar, M., Bischoff, W.-A., & Siebe, C. (2018). Ammonium-nitrate dynamics in the critical zone during single irrigation events with untreated sewage effluents. *Journal of Soils and Sediments*, *18*(2), 467–480. https://doi.org/10.1007/s11368-016-1506-2

Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, *311*(1–2), 1–18. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3

Hesterberg, D. (1998). Biogeochemical cycles and processes leading to changes in mobility of chemicals in soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *67*(2–3), 121–133. https://doi.org/10.1016/S0167-8809(97)00110-2

Hlavay, J., Vigh, G. Y., Olaszi, V., & Inczédy, J. (1982). Investigations on natural Hungarian zeolite for ammonia removal. *Water Research*, *16*(4), 417–420. https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90165-8

Hodgskiss, L. H., Melcher, M., Kerou, M., Chen, W., Ponce-Toledo, R. I., Savvides, S. N., Wienkoop, S., Hartl, M., & Schleper, C. (2023). Unexpected complexity of the ammonia monooxygenase in archaea. *The ISME Journal*, *17*(4), 588–599. https://doi.org/10.1038/s41396-023-01367-3

Hu, H.-W., & He, J.-Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, *17*(12), 2709–2717. https://doi.org/10.1007/s11368-017-1851-9

Hu, H.-W., Zhang, L.-M., Dai, Y., Di, H.-J., & He, J.-Z. (2013). pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing. *Journal of Soils and Sediments*, *13*(8), 1439–1449. https://doi.org/10.1007/s11368-013-0726-y

Hu, H.-W., Zhang, L.-M., Yuan, C.-L., Zheng, Y., Wang, J.-T., Chen, D., & He, J.-Z. (2015). The large-scale distribution of ammonia oxidizers in paddy soils is driven by soil pH, geographic distance, and climatic factors. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00938

Hu, J., Richwine, J. D., Keyser, P. D., Li, L., Yao, F., Jagadamma, S., & DeBruyn, J. M. (2021). Ammonia-oxidizing bacterial communities are affected by nitrogen fertilization and grass species in native C4 grassland soils. *PeerJ*, *9*, e12592. https://doi.org/10.7717/peerj.12592

Huang, L., Chakrabarti, S., Cooper, J., Perez, A., John, S. M., Daroub, S. H., & Martens-Habbena, W. (2021). Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil. *ISME Communications*, *1*(1), 19. https://doi.org/10.1038/s43705-021-00020-4

Hugerth, L. W., & Andersson, A. F. (2017). Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561

Ibekwe, A. M., Gonzalez-Rubio, A., & Suarez, D. L. (2018). Impact of treated wastewater for irrigation on soil microbial communities. *Science of The Total Environment*, *622–623*, 1603–1610. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.039

Ida, T., Satoh, M., Yabe, R., Takahashi, R., & Tokuyama, T. (2004). Identification of genus Nitrosovibrio, ammonia-oxidizing bacteria, by comparison of N-terminal amino acid sequences of phosphoglycerate kinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *98*(5), 380–383. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)00299-3

Ingrao, C., Strippoli, R., Lagioia, G., & Huisingh, D. (2023). Water scarcity in agriculture: An overview of causes, impacts and approaches for reducing the risks. *Heliyon*, *9*(8), e18507. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18507

Jechalke, S., Broszat, M., Lang, F., Siebe, C., Smalla, K., & Grohmann, E. (2015). Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00163

Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M., van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. M., & Kuenen, J. G. (1998). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, *22*(5), 421–437. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00379.x

Jia, Y., & Whalen, J. K. (2020). A new perspective on functional redundancy and phylogenetic niche conservatism in soil microbial communities. *Pedosphere*, *30*(1), 18–24. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60826-X

Jia, Z., & Conrad, R. (2009). Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, *11*(7), 1658–1671. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01891.x

Jiang, H., Huang, L., Deng, Y., Wang, S., Zhou, Y., Liu, L., & Dong, H. (2014). Latitudinal Distribution of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in the Agricultural Soils of Eastern China. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(18), 5593–5602. https://doi.org/10.1128/AEM.01617-14

Jiang, Y., Wu, J., Liu, M., Zhu, Y., Wen, Q., Lin, W., & Luo, J. (2023). Growth and N2O production of Nitrosocosmicus clade in agricultural soil when responding to high ammonium inputs. *Journal of Soils and Sediments*, *23*(9), 3458–3471. https://doi.org/10.1007/s11368-023-03547-2

Jiao, S., Chen, W., & Wei, G. (2022). Core microbiota drive functional stability of soil microbiome in reforestation ecosystems. *Global Change Biology*, *28*(3), 1038–1047. https://doi.org/10.1111/gcb.16024

Jiao, S., Xu, Y., Zhang, J., Hao, X., & Lu, Y. (2019). Core Microbiota in Agricultural Soils and Their Potential Associations with Nutrient Cycling. *MSystems*, *4*(2). https://doi.org/10.1128/mSystems.00313-18

Jiménez, B., & Chávez, A. (2002). Low cost technology for reliable use of Mexico City's wastewater for agricultural irrigation. *Technology*, *9*(1), 95–107.

Jiménez, B., Chávez, A., Maya, C., & Jardines, L. (2001). Removal of microorganisms in different stages of wastewater treatment for Mexico City. *Water Science and Technology*, *43*(10), 155–162. https://doi.org/10.2166/wst.2001.0607

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., & Wagner, M. (1998). Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira* -Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(8), 3042–3051. https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.3042-3051.1998

Kikuchi, S., Fujitani, H., Ishii, K., Isshiki, R., Sekiguchi, Y., & Tsuneda, S. (2023). Characterisation of bacteria representing a novel *Nitrosomonas* clade: Physiology, genomics and distribution of missing ammonia oxidizer. *Environmental Microbiology Reports*, *15*(5), 404–416. https://doi.org/10.1111/1758-2229.13158

Kim, J., Lim, J., & Lee, C. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*, *31*(8), 1358–1373. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010

Kiziloglu, F. M., Turan, M., Sahin, U., Kuslu, Y., & Dursun, A. (2008). Effects of untreated and treated wastewater irrigation on some chemical properties of cauliflower (Brassica olerecea L. var. botrytis) and red cabbage (Brassica olerecea L. var. rubra) grown on calcareous soil in Turkey. *Agricultural Water Management*, *95*(6), 716–724. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.01.008

Kozlowski, J. A., Kits, K. D., & Stein, L. Y. (2016). Genome Sequence of Nitrosomonas communis Strain Nm2, a Mesophilic Ammonia-Oxidizing Bacterium Isolated from Mediterranean Soil. *Genome Announcements*, *4*(1). https://doi.org/10.1128/genomeA.01541-15

Kriška, M., Němcová, M., & Hyánková, E. (2018). The influence of ammonia on groundwater quality during wastewater irrigation. *Soil and Water Research*, *13*(3), 161–169. https://doi.org/10.17221/124/2017-SWR

Krümmel, A., & Harms, H. (1982). Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology*, *133*(1), 50–54. https://doi.org/10.1007/BF00943769

Lakay, F. M., Botha, A., & Prior, B. A. (2007). Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(1), 265–273. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03052.x

Leal, R. M. P., Firme, L. P., Herpin, U., da Fonseca, A. F., Montes, C. R., dos Santos Dias, C. T., & Melfi, A. J. (2010). Carbon and nitrogen cycling in a tropical Brazilian soil cropped with sugarcane and irrigated with wastewater. *Agricultural Water Management*, *97*(2), 271–276. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.09.018

Lehtovirta-Morley, L. E. (2018). Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(9). https://doi.org/10.1093/femsle/fny058

Lehtovirta-Morley, L. E., Ross, J., Hink, L., Weber, E. B., Gubry-Rangin, C., Thion, C., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2016). Isolation of ' *Candidatus* Nitrosocosmicus franklandus', a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high

ammonia concentration. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(5), fiw057. https://doi.org/10.1093/femsec/fiw057

Lehtovirta-Morley, L. E., Stoecker, K., Vilcinskas, A., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2011). Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 15892–15897. https://doi.org/10.1073/pnas.1107196108

Lesser, L. E., Mora, A., Moreau, C., Mahlknecht, J., Hernández-Antonio, A., Ramírez, A. I., & Barrios-Piña, H. (2018). Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere*, *198*, 510–521. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.154

Li, B., Cao, Y., Guan, X., Li, Y., Hao, Z., Hu, W., & Chen, L. (2019). Microbial assessments of soil with a 40-year history of reclaimed wastewater irrigation. *Science of The Total Environment*, *651*, 696–705. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.193

Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T.-W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct *de Bruijn* graph. *Bioinformatics*, *31*(10), 1674–1676. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033

Li, M., Xue, L., Zhou, B., Duan, J., He, Z., Wang, X., Xu, X., & Yang, L. (2020). Effects of domestic sewage from different sources on greenhouse gas emission and related microorganisms in straw-returning paddy fields. *Science of The Total Environment*, *718*, 137407. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137407

Li, P., Karunanidhi, D., Subramani, T., & Srinivasamoorthy, K. (2021). Sources and Consequences of Groundwater Contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *80*(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/s00244-020-00805-z

Li, P.-P., Han, Y.-L., He, J.-Z., Zhang, S.-Q., & Zhang, L.-M. (2019). Soil aggregate size and long-term fertilization effects on the function and community of ammonia oxidizers. *Geoderma*, *338*, 107–117. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.11.033

Li, Z., Zeng, Z., Tian, D., Wang, J., Fu, Z., Zhang, F., Zhang, R., Chen, W., Luo, Y., & Niu, S. (2020). Global patterns and controlling factors of soil nitrification rate. *Global Change Biology*, *26*(7), 4147–4157. https://doi.org/10.1111/gcb.15119

Lin, C., Xu, H., Qin, W., Xu, S., Tang, X., Kuang, L., Wang, X., Jiang, B., Chen, J., Shan, J., Adams, J., Qin, H., & Wang, B. (2020). Evaluation of Two Primer Sets for Amplification of Comammox Nitrospira amoA Genes in Wetland Soils. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560942

Liu, X., Zhang, Y., Ren, X., Shen, C., Wang, F., & Wu, D. (2021). Influences of nitrogen forms on abundances and community structures of ammonia and nitrite oxidizers in a slightly alkaline upland soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *67*(2), 152–165. https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1718113

Liu, Y., Neal, A. L., Zhang, X., Cui, E., Gao, F., Fan, X., Hu, C., & Li, Z. (2019). Increasing livestock wastewater application in alternate-furrow irrigation reduces nitrification gene abundance but not nitrification rate in rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, *55*(5), 439–455. https://doi.org/10.1007/s00374-019-01361-y

Lüneberg, K., Schneider, D., Brinkmann, N., Siebe, C., & Daniel, R. (2019). Land Use Change and Water Quality Use for Irrigation Alters Drylands Soil Fungal Community in the Mezquital Valley, Mexico. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01220

Lüneberg, K., Schneider, D., Siebe, C., & Daniel, R. (2018). Drylands soil bacterial community is affected by land use change and different irrigation practices in the Mezquital Valley, Mexico. *Scientific Reports*, *8*(1), 1413. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19743-x

Madsen, E. L. (2011). Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(3), 456–464. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.008

Mancosu, N., Snyder, R., Kyriakakis, G., & Spano, D. (2015). Water Scarcity and Future Challenges for Food Production. *Water*, *7*(12), 975–992. https://doi.org/10.3390/w7030975

Mansfeldt, C., Deiner, K., Mächler, E., Fenner, K., Eggen, R. I. L., Stamm, C., Schönenberger, U., Walser, J.-C., & Altermatt, F. (2020). Microbial community shifts in streams receiving treated wastewater effluent. *Science of The Total Environment*, *709*, 135727. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135727

Marsh, K. L., Sims, G. K., & Mulvaney, R. L. (2005). Availability of urea to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as related to the fate of 14C- and 15N-labeled urea added to soil. *Biology and Fertility of Soils*, *42*(2), 137–145. https://doi.org/10.1007/s00374-005-0004-2

Martijn, E.-J., & Redwood, M. (2005). Wastewater irrigation in developing countries—limitations for farmers to adopt appropriate practices. *Irrigation and Drainage*, *54*(S1), S63–S70. https://doi.org/10.1002/ird.186

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Meng, S., Peng, T., Wang, H., Huang, T., Gu, J.-D., & Hu, Z. (2022). Evaluation of PCR primers for detecting the distribution of nitrifiers in mangrove sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(17), 5811–5822. https://doi.org/10.1007/s00253-022-12104-9

Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016a). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, *7*(1), 11257. https://doi.org/10.1038/ncomms11257

Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016b). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, *7*(1), 11257. https://doi.org/10.1038/ncomms11257

Mertens, J., Wakelin, S. A., Broos, K., McLaughlin, M. J., & Smolders, E. (2010). Extent of copper tolerance and consequences for functional stability of the ammonia-oxidizing community in long-term copper-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *29*(1), 27–37. https://doi.org/10.1002/etc.16

Mignardi, M., & Nilsson, M. (2014). Fourth-generation sequencing in the cell and the clinic. *Genome Medicine*, *6*(4), 31. https://doi.org/10.1186/gm548

Minami, K. (2021). Soil is a living substance. *Soil Science and Plant Nutrition*, *67*(1), 26–30. https://doi.org/10.1080/00380768.2020.1827939

Mireles, A., Solís, C., Andrade, E., Lagunas-Solar, M., Piña, C., & Flocchini, R. G. (2004). Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico city. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, *219–220*, 187–190. https://doi.org/10.1016/j.nimb.2004.01.051

Modi, A., Vai, S., Caramelli, D., & Lari, M. (2021). *The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System* (pp. 15–42). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1099-2_2

Morimoto, S., Hayatsu, M., Takada Hoshino, Y., Nagaoka, K., Yamazaki, M., Karasawa, T., Takenaka, M., & Akiyama, H. (2011). Quantitative Analyses of Ammonia-oxidizing Archaea (AOA) and Ammonia-oxidizing Bacteria (AOB) in Fields with Different Soil Types. *Microbes and Environments*, *26*(3), 248–253. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11127

Mortimore, M., Anderson, S., Cotula, L., Davies, J., Faccer, K., Hesse, C., Morton, J., Nyangena, W., Skinner, J., & Wolfangel, C. (2009). *Dryland Opportunies: A new paradigm for people, ecosystems and development*. International Union for Conservation of Nature (IUCN).

Naitam, M. G., & Kaushik, R. (2021). Archaea: An Agro-Ecological Perspective. *Current Microbiology*, *78*(7), 2510–2521. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02537-2

Nakagawa, T., & Takahashi, R. (2015). Nitrosomonas stercoris sp. nov., a Chemoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacterium Tolerant of High Ammonium Isolated from Composted Cattle Manure. *Microbes and Environments*, *30*(3), 221–227. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15072

Nakagawa, T., Tsuchiya, Y., & Takahashi, R. (2019). Whole-Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium Nitrosomonas stercoris Type Strain KYUHI-S, Isolated from Composted Cattle Manure. *Microbiology Resource Announcements*, *8*(34). https://doi.org/10.1128/MRA.00742-19

Namiki, T., Hachiya, T., Tanaka, H., & Sakakibara, Y. (2011). MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Proceedings of the 2nd ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine*, 116–124. https://doi.org/10.1145/2147805.2147818

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, *54*(4), 655–670. https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x

Naranjo Pérez de León, M. F., & Biswas, A. K. (1997). Water, Wastewater, and Environmental Security Problems: A Case Study of Mexico City and the Mezquital Valley. *Water International*, *22*(3), 207–214. https://doi.org/10.1080/02508060.2003.10844602

Ndour, N. Y. B., Baudoin, E., Guissé, A., Seck, M., Khouma, M., & Brauman, A. (2008). Impact of irrigation water quality on soil nitrifying and total bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils*, *44*(5), 797–803. https://doi.org/10.1007/s00374-008-0285-3

Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C., & Prosser, J. I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and

bacteria. *Environmental Microbiology*, *10*(11), 2966–2978. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x

Nie, S., Zhu, G.-B., Singh, B., & Zhu, Y.-G. (2019). Anaerobic ammonium oxidation in agricultural soils-synthesis and prospective. *Environmental Pollution*, *244*, 127–134. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.050

Nkongolo, K. K., & Narendrula-Kotha, R. (2020). Advances in monitoring soil microbial community dynamic and function. *Journal of Applied Genetics*, *61*(2), 249–263. https://doi.org/10.1007/s13353-020-00549-5

Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., & Klotz, M. G. (2002). Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology*, *177*(2), 139–149. https://doi.org/10.1007/s00203-001-0369-z

Norton, J., & Ouyang, Y. (2019). Controls and Adaptive Management of Nitrification in Agricultural Soils. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01931

Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, *27*(5), 824–834. https://doi.org/10.1101/gr.213959.116

Omar, S. A., & Ismail, M. A. (1999). Microbial populations, ammonification and nitrification in soil treated with urea and inorganic salts. *Folia Microbiologica*, *44*(2), 205–212. https://doi.org/10.1007/BF02816244

Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 385. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385

Orschler, L., Agrawal, S., & Lackner, S. (2020). Lost in translation: the quest for Nitrosomonas cluster 7-specific amoA primers and TaqMan probes. *Microbial Biotechnology*, *13*(6), 2069–2076. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13627

Ouyang, Y., & Norton, J. M. (2020). Nitrite Oxidizer Activity and Community Are More Responsive Than Their Abundance to Ammonium-Based Fertilizer in an Agricultural Soil. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01736

Ouyang, Y., Norton, J. M., & Stark, J. M. (2017). Ammonium availability and temperature control contributions of ammonia oxidizing bacteria and archaea to nitrification in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *113*, 161–172. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.010

Ouyang, Y., Norton, J. M., Stark, J. M., Reeve, J. R., & Habteselassie, M. Y. (2016). Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *96*, 4–15. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.012

Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. T., & Minz, D. (2001). Influence of Effluent Irrigation on Community Composition and Function of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(8), 3426–3433. https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3426-3433.2001

Pankhurst, C. E., Ophel-Keller, K., Doube, B. M., & Gupta, V. V. S. R. (1996). Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodiversity and Conservation*, *5*(2), 197–209. https://doi.org/10.1007/BF00055830

Paz-Ferreiro, J., & Fu, S. (2016). Biological Indices for Soil Quality Evaluation: Perspectives and Limitations. *Land Degradation & Development*, *27*(1), 14–25. https://doi.org/10.1002/ldr.2262

Pérez Díaz, J. P., Ortega Escobar, H. M., Ramírez Ayala, C., Flores Magdaleno, H., Sánchez Bernal, E. I., Can Chulim, Á., & Mancilla Villa, O. R. (2018). Nitrate, phosphate and boron content in wastewater for crop irrigation in Mezquital Valley, Hidalgo. *Nova Scientia*, *10*(21), 97–119. https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1478

Pérez-Díaz, J. P., Ortega-Escobar, H. M., Ramírez-Ayala, C., Flores-Magdaleno, H., Sánchez-Bernal, E. I., Can-Chulim, Á., & Mancilla-Villa, O. R. (2019). Evaluación de la calidad del agua residual para el riego agrícola en Valle del Mezquital, Hidalgo. *Acta Universitaria*, *29*, 1–21. https://doi.org/10.15174/au.2019.2117

Pessi, I. S., Rutanen, A., & Hultman, J. (2022). *Candidatus* Nitrosopolaris, a genus of putative ammonia-oxidizing archaea with a polar/alpine distribution. *FEMS Microbes*, *3*. https://doi.org/10.1093/femsmc/xtac019

Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngröft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A., & Wagner, M. (2012). amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, *14*(2), 525–539. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02666.x

Phillips, R. P., Finzi, A. C., & Bernhardt, E. S. (2011). Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO_2 fumigation. *Ecology Letters*, *14*(2), 187–194. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01570.x

Ponce-Lira, B., Serrano-Olvera, M., Rodríguez-Martínez, N., & Sánchez-Herrera, S. G. (2020). *Polluted Wastewater for Irrigation in the Mezquital Valley, Mexico* (pp. 215–231). https://doi.org/10.1007/978-3-030-24962-5_10

Poretsky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLoS ONE*, *9*(4), e93827. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827

Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, *28*(5), 848–861. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008

Prosser, J. I. (2014). Soil Nitrifiers and Nitrification. In *Nitrification* (pp. 347–383). ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555817145.ch14

Qadir, M., Wichelns, D., Raschid-Sally, L., McCornick, P. G., Drechsel, P., Bahri, A., & Minhas, P. S. (2010). The challenges of wastewater irrigation in developing countries. *Agricultural Water Management*, *97*(4), 561–568. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.11.004

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590–D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

Quinton, J. N., Govers, G., Van Oost, K., & Bardgett, R. D. (2010). The impact of agricultural soil erosion on biogeochemical cycling. *Nature Geoscience*, *3*(5), 311–314. https://doi.org/10.1038/ngeo838

Ramirez-Fuentes, E., Lucho-Constantino, C., Escamilla-Silva, E., & Dendooven, L. (2002). Characteristics, and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. *Bioresource Technology*, *85*(2), 179–187. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00035-4

Ranjard, L., Poly, F., & Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, *151*(3), 167–177. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00136-4

Ribas, M. M. F., Cereda, M. P., & Villas Bôas, R. L. (2010). Use of cassava wastewater treated anaerobically with alkaline agents as fertilizer for maize (Zea mays L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*(1), 55–62. https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100007

Rijsberman, F. R. (2006). Water scarcity: Fact or fiction? *Agricultural Water Management*, *80*(1–3), 5–22. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.07.001

Rodriguez, R. D. G., Pruski, F. F., & Singh, V. P. (2016). Estimated Per Capita Water Usage Associated with Different Levels of Water Scarcity Risk in Arid and Semiarid Regions. *Water Resources Management*, *30*(4), 1311–1324. https://doi.org/10.1007/s11269-016-1236-7

Rodríguez-Varela, M., Durán-Álvarez, J. C., Jiménez-Cisneros, B., Zamora, O., & Prado, B. (2021). Occurrence of perfluorinated carboxylic acids in Mexico City's wastewater: A monitoring study in the sewerage and a mega wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment*, *774*, 145060. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145060

Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(1), 39–67. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x

Rother, J. A., Millbank, J. W., & Thornton, I. (1982). Effects of heavy-metal additions on ammonification and nitrification in soils contaminated with cadmium, lead and zinc. *Plant and Soil*, *69*(2), 239–258. https://doi.org/10.1007/BF02374519

Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(12), 4704–4712. https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997

Rousk, J., & Bengtson, P. (2014). Microbial regulation of global biogeochemical cycles. *Frontiers in Microbiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00103

Rusan, M. J. M., Hinnawi, S., & Rousan, L. (2007). Long term effect of wastewater irrigation of forage crops on soil and plant quality parameters. *Desalination*, *215*(1–3), 143–152. https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.10.032

Sahrawat, K. L. (2008). Factors Affecting Nitrification in Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *39*(9–10), 1436–1446. https://doi.org/10.1080/00103620802004235

Sánchez–González, A., Chapela–Lara, M., Germán–Venegas, E., Fuentes-García, R., Río-Portilla, F. del, & Siebe, C. (2017). Changes in quality and quantity of soil organic matter stocks resulting from wastewater irrigation in formerly forested land. *Geoderma*, *306*, 99–107. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.07.009

Sardinha, M., Müller, T., Schmeisky, H., & Joergensen, R. G. (2003). Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. *Applied Soil Ecology*, *23*(3), 237–244. https://doi.org/10.1016/S0929-1393(03)00027-1

Schloter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J., & van Elsas, J. D. (2018). Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, *54*(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3

Schmidt, E. L. (2015). *Nitrification in Soil* (pp. 253–288). https://doi.org/10.2134/agronmonogr22.c7

Schreiter, S., Ding, G.-C., Heuer, H., Neumann, G., Sandmann, M., Grosch, R., Kropf, S., & Smalla, K. (2014). Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Frontiers in Microbiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00144

Schulz, S., Brankatschk, R., Dümig, A., Kögel-Knabner, I., Schloter, M., & Zeyer, J. (2013). The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. *Biogeosciences*, *10*(6), 3983–3996. https://doi.org/10.5194/bg-10-3983-2013

Scott, C. A., Faruqui, N. I., & Raschid-Sally, L. (2004). Wastewater use in irrigated agriculture: management challenges in developing countries. In *Wastewater use in irrigated agriculture: confronting the livelihood and environmental realities* (pp. 1–10). CABI Publishing. https://doi.org/10.1079/9780851998237.0001

Seckler, D., Barker, R., & Amarasinghe, U. (1999). Water Scarcity in the Twenty-first Century. *International Journal of Water Resources Development*, *15*(1–2), 29–42. https://doi.org/10.1080/07900629948916

Sengupta, S., Nawaz, T., & Beaudry, J. (2015). Nitrogen and Phosphorus Recovery from Wastewater. *Current Pollution Reports*, *1*(3), 155–166. https://doi.org/10.1007/s40726-015-0013-1

Şentürk, E., Atasoy, G., & Şanlıbaba, P. (2023). Ammonia-Oxidizing Bacteria: Biochemical and Molecular Characteristics. In *Anammox Technology in Industrial Wastewater Treatment* (pp. 11–33). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3459-1_2

Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zhang, J., & He, J. (2008). Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, *10*(6), 1601–1611. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01578.x

Shen, J.-P., Xu, Z., & He, J.-Z. (2014). Frontiers in the microbial processes of ammonia oxidation in soils and sediments. *Journal of Soils and Sediments*, *14*(6), 1023–1029. https://doi.org/10.1007/s11368-014-0872-x

Siebe, C. (1995). Heavy metal availability to plants in soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Water Science and Technology*, *32*(12). https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00135-7

Siebe, C., & Cifuentes, E. (1995). Environmental impact of wastewater irrigation in central Mexico: An overview. *International Journal of Environmental Health Research*, *5*(2), 161–173. https://doi.org/10.1080/09603129509356845

Siebe, C., & Fischer, W. R. (1996). Effect of long-term irrigation with untreated sewage effluents on soil properties and heavy metal adsorption of leptosols and vertisols in

Central Mexico. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, *159*(4), 357–364. https://doi.org/10.1002/jpln.1996.3581590408

Singh, A. (2021). A review of wastewater irrigation: Environmental implications. *Resources, Conservation and Recycling*, *168*, 105454. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105454

Slobodiuk, S., Niven, C., Arthur, G., Thakur, S., & Ercumen, A. (2021). Does Irrigation with Treated and Untreated Wastewater Increase Antimicrobial Resistance in Soil and Water: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(21), 11046. https://doi.org/10.3390/ijerph182111046

Smith, P., Cotrufo, M. F., Rumpel, C., Paustian, K., Kuikman, P. J., Elliott, J. A., McDowell, R., Griffiths, R. I., Asakawa, S., Bustamante, M., House, J. I., Sobocká, J., Harper, R., Pan, G., West, P. C., Gerber, J. S., Clark, J. M., Adhya, T., Scholes, R. J., & Scholes, M. C. (2015). Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. *SOIL*, *1*(2), 665–685. https://doi.org/10.5194/soil-1-665-2015

Soliman, M., & Eldyasti, A. (2018). Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *17*(2), 285–321. https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4

Sparks, D. (1996). *Methods of Soil Analysis*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3

Staley, C., Breuillin-Sessoms, F., Wang, P., Kaiser, T., Venterea, R. T., & Sadowsky, M. J. (2018). Urea Amendment Decreases Microbial Diversity and Selects for Specific Nitrifying Strains in Eight Contrasting Agricultural Soils. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00634

Stieglmeier, M., Klingl, A., Alves, R. J. E., Rittmann, S. K.-M. R., Melcher, M., Leisch, N., & Schleper, C. (2014). Nitrososphaera viennensis gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(Pt_8), 2738–2752. https://doi.org/10.1099/ijs.0.063172-0

Subba Rao, A., Jha, P., Meena, B. P., Biswas, A. K., Lakaria, B. L., & Patra, A. K. (2017). Nitrogen Processes in Agroecosystems of India. In *The Indian Nitrogen Assessment* (pp. 59–76). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811836-8.00005-7

Subbarao, G. V., Sahrawat, K. L., Nakahara, K., Rao, I. M., Ishitani, M., Hash, C. T., Kishii, M., Bonnett, D. G., Berry, W. L., & Lata, J. C. (2013). A paradigm shift towards low-nitrifying production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of Botany*, *112*(2), 297–316. https://doi.org/10.1093/aob/mcs230

Sun, R., Myrold, D. D., Wang, D., Guo, X., & Chu, H. (2019). AOA and AOB communities respond differently to changes of soil pH under long-term fertilization. *Soil Ecology Letters*, *1*(3–4), 126–135. https://doi.org/10.1007/s42832-019-0016-8

Tang, J., Su, L., Fang, Y., Wang, C., Meng, L., Wang, J., Zhang, J., & Xu, W. (2023). Moderate Nitrogen Reduction Increases Nitrogen Use Efficiency and Positively Affects Microbial Communities in Agricultural Soils. *Agriculture*, *13*(4), 796. https://doi.org/10.3390/agriculture13040796

Tang, Q., Xia, L., Ti, C., Zhou, W., Fountain, L., Shan, J., & Yan, X. (2020). Oxytetracycline, copper, and zinc effects on nitrification processes and microbial activity in two soil types. *Food and Energy Security*, *9*(4). https://doi.org/10.1002/fes3.248

Tang, S., Wang, C., & Ji, G. (2021). Response of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to streptomycin sulfate and penicillin in coastal wetlands along the Bohai Rim. *Land Degradation & Development*, *32*(5), 1917–1926. https://doi.org/10.1002/ldr.3820

Taş, N., de Jong, A. E., Li, Y., Trubl, G., Xue, Y., & Dove, N. C. (2021). Metagenomic tools in microbial ecology research. *Current Opinion in Biotechnology*, *67*, 184–191. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.019

Taylor, A. E., & Bottomley, P. J. (2006). Nitrite production by Nitrosomonas europaea and Nitrosospira sp. AV in soils at different solution concentrations of ammonium. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(4), 828–836. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.001

Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T. L., & Flynn, S. J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, *13*(2), 109–122. https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00026-8

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, *5*(3), 240–245. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7

Tsigoida, A., & Argyrokastritis, I. (2019). The effect of sub-irrigation with untreated and treated municipal wastewater on organic matter and Nitrogen content on two soil types. *Global NEST Journal*. https://doi.org/10.30955/gnj.002810

Urroz, E. (1977). Reutilization of residual water and its effects on agriculture. In *Arid Land Irrigation in Developing Countries* (pp. 361–370). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-021588-4.50052-X

Vázquez-Salvador, N., Silva-Magaña, M. A., Tapia-Palacios, M. A., Mora-López, M., Félix-Arellano, E., Rodríguez-Dozál, S., Riojas-Rodríguez, H., & Mazari-Hiriart, M. (2020). Household water quality in areas irrigated with wastewater in the Mezquital Valley, Mexico. *Journal of Water and Health*, *18*(6), 1098–1109. https://doi.org/10.2166/wh.2020.095

Vela-Cano, M., Gómez-Brandón, M., Pesciaroli, C., Insam, H., & González-López, J. (2018). Study of Total Bacteria and Ammonia-Oxidizing Bacteria and Ammonia-Oxidizing Archaea in Response to Irrigation with Sewage Sludge Compost Tea in Agricultural Soil. *Compost Science & Utilization*, *26*(3), 145–155. https://doi.org/10.1080/1065657X.2018.1432429

Veresoglou, S. D., Sen, R., Mamolos, A. P., & Veresoglou, D. S. (2011). Plant species identity and arbuscular mycorrhizal status modulate potential nitrification rates in nitrogen-limited grassland soils. *Journal of Ecology*, *99*(6), 1339–1349. https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01863.x

Verhamme, D. T., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2011). Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME Journal*, *5*(6), 1067–1071. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.191

Wafula, D., White, J. R., Canion, A., Jagoe, C., Pathak, A., & Chauhan, A. (2015). Impacts of Long-Term Irrigation of Domestic Treated Wastewater on Soil Biogeochemistry and

Bacterial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7143–7158. https://doi.org/10.1128/AEM.02188-15

Walder, F., Schmid, M. W., Riedo, J., Valzano-Held, A. Y., Banerjee, S., Büchi, L., Bucheli, T. D., & van der Heijden, M. G. A. (2022). Soil microbiome signatures are associated with pesticide residues in arable landscapes. *Soil Biology and Biochemistry*, *174*, 108830. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108830

Wallace, J. S. (2000). Increasing agricultural water use efficiency to meet future food production. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *82*(1–3), 105–119. https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00220-6

Wang, Q., Chen, Z., Zhao, J., Ma, J., Yu, Q., Zou, P., Lin, H., & Ma, J. (2022). Fate of heavy metals and bacterial community composition following biogas slurry application in a single rice cropping system. *Journal of Soils and Sediments*, *22*(3), 968–981. https://doi.org/10.1007/s11368-021-03117-4

Wen, C., Wu, L., Qin, Y., Van Nostrand, J. D., Ning, D., Sun, B., Xue, K., Liu, F., Deng, Y., Liang, Y., & Zhou, J. (2017). Evaluation of the reproducibility of amplicon sequencing with Illumina MiSeq platform. *PLOS ONE*, *12*(4), e0176716. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176716

Wertz, S., Leigh, A. K. K., & Grayston, S. J. (2012). Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. *FEMS Microbiology Ecology*, *79*(1), 142–154. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01204.x

Wessén, E., & Hallin, S. (2011). Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers – Possible bioindicator for soil monitoring. *Ecological Indicators*, *11*(6), 1696–1698. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.04.018

White, T., Brantley, S., Banwart, S., Chorover, J., Dietrich, W., Derry, L., Lohse, K., Anderson, S., Aufdendkampe, A., Bales, R., Kumar, P., Richter, D., & McDowell, B. (2015). The Role of Critical Zone Observatories in Critical Zone Science. In *Principles and Dynamics of the Critical Zone* (Vol. 19, pp. 15–78). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63369-9.00002-1

Wu, L., Chen, X., Wei, W., Liu, Y., Wang, D., & Ni, B.-J. (2020). A Critical Review on Nitrous Oxide Production by Ammonia-Oxidizing Archaea. *Environmental Science & Technology*, *54*(15), 9175–9190. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03948

Wu, Q., & Liu, W.-T. (2009). Determination of virus abundance, diversity and distribution in a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, *43*(4), 1101–1109. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.039

Wu, X., Peng, J., Liu, P., Bei, Q., Rensing, C., Li, Y., Yuan, H., Liesack, W., Zhang, F., & Cui, Z. (2021). Metagenomic insights into nitrogen and phosphorus cycling at the soil aggregate scale driven by organic material amendments. *Science of The Total Environment*, *785*, 147329. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147329

Wu, Y., Lu, L., Wang, B., Lin, X., Zhu, J., Cai, Z., Yan, X., & Jia, Z. (2011). Long-Term Field Fertilization Significantly Alters Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria rather than Archaea in a Paddy Soil. *Soil Science Society of America Journal*, *75*(4), 1431–1439. https://doi.org/10.2136/sssaj2010.0434

Xiao, R., Ran, W., Hu, S., & Guo, H. (2021). The response of ammonia oxidizing archaea and bacteria in relation to heterotrophs under different carbon and nitrogen

amendments in two agricultural soils. *Applied Soil Ecology*, *158*, 103812. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103812

Xie, J., Yan, J., He, H., Lin, D., Chen, Y., Li, Y., Huang, X., & Zhang, H. (2021). Evaluation of the key factors to dominate aerobic ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *164*, 105289. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105289

Xu, D., Zhang, C., Qu, S., Ma, X., & Gao, M. (2012). Characterization of microorganisms in the soils with sewage irrigations. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(44), 7168–7175.

Xu, H., Du, H., Zeng, F., Song, T., & Peng, W. (2021). Diminished rhizosphere and bulk soil microbial abundance and diversity across succession stages in Karst area, southwest China. *Applied Soil Ecology*, *158*, 103799. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103799

Xu, J., Wu, L., Chang, A. C., & Zhang, Y. (2010). Impact of long-term reclaimed wastewater irrigation on agricultural soils: A preliminary assessment. *Journal of Hazardous Materials*, *183*(1–3), 780–786. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.094

Xu, X., Liu, S., Zhu, X., & Guo, X. (2020). Comparative Study on Soil Microbial Diversity and Structure Under Wastewater and Groundwater Irrigation Conditions. *Current Microbiology*, *77*(12), 3909–3918. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02219-5

Yan, J., Quan, G., & Ding, C. (2013). Effects of the Combined Pollution of Lead and Cadmium on Soil Urease Activity and Nitrification. *Procedia Environmental Sciences*, *18*, 78–83. https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.04.011

Yang, Y., Wang, Z., Hu, Y., & Zeng, Z. (2017). Irrigation frequency alters the abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in a northern Chinese upland soil. *European Journal of Soil Biology*, *83*, 34–42. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.09.005

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D643–D648. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209

Ying, J., Li, X., Wang, N., Lan, Z., He, J., & Bai, Y. (2017). Contrasting effects of nitrogen forms and soil pH on ammonia oxidizing microorganisms and their responses to long-term nitrogen fertilization in a typical steppe ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, *107*, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.023

Yu, S., Yao, P., Liu, J., Zhao, B., Zhang, G., Zhao, M., Yu, Z., & Zhang, X.-H. (2016). Diversity, Abundance, and Niche Differentiation of Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in Mud Deposits of the Eastern China Marginal Seas. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00137

Zhalnina, K. V., Dias, R., Leonard, M. T., Dorr de Quadros, P., Camargo, F. A. O., Drew, J. C., Farmerie, W. G., Daroub, S. H., & Triplett, E. W. (2014). Genome Sequence of Candidatus Nitrososphaera evergladensis from Group I.1b Enriched from Everglades Soil Reveals Novel Genomic Features of the Ammonia-Oxidizing Archaea. *PLoS ONE*, *9*(7), e101648. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101648

Zhang, L., Guan, Y., & Jiang, S. C. (2021). Investigations of soil autotrophic ammonia oxidizers in farmlands through genetics and big data analysis. *Science of The Total Environment*, *777*, 146091. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146091

Zhang, L.-M., Hu, H.-W., Shen, J.-P., & He, J.-Z. (2012). Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal*, *6*(5), 1032–1045. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.168

Zhang, Y., & Shen, Y. (2019). Wastewater irrigation: past, present, and future. *WIREs Water*, *6*(3). https://doi.org/10.1002/wat2.1234

Zhao, Y., Lu, Y., Zhuang, H., & Shan, S. (2023). In-situ retention of nitrogen, phosphorus in agricultural drainage and soil nutrients by biochar at different temperatures and the effects on soil microbial response. *Science of The Total Environment*, *904*, 166292. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166292

Zhou, X., Guo, Z., Chen, C., & Jia, Z. (2017). Soil microbial community structure and diversity are largely influenced by soil pH and nutrient quality in 78-year-old tree plantations. *Biogeosciences*, *14*(8), 2101–2111. https://doi.org/10.5194/bg-14-2101-2017

15 Anexos

Anexo A1. Rangos de las propiedades fisicoquímicas de las aguas utilizadas para el riego de las columnas

	Agua residual (WW)	**Agua tratada (TW)**
pH*	7.2 – 8.5	7.16 – 8.2
CE (µS/cm)*	2005 – 2268	2174 – 2233
COD (mg C/L)*	22.1 – 41.7	17.5 – 23.2
NH_4^+ (mg/L N-NH_4^+)	28.3 – 35.9	16.4 – 21.8

* Datos tomados de Alvarez Olivares (2023)

Anexo A2. Tabla de análisis de calidad de los ensamblajes metagenómicos

	Longitud total (pb)	# contigs	Contig más grande (pb)	N50	L50
0 años					
metaSPAdes	543,797,268	689,075	45,562	762	239,226
MEGAHIT	433,443,090	520,344	48,056	811	173,984
25 años					
metaSPAdes	577,716,373	718,438	67,440	779	245,766
MEGAHIT	451,906,972	541,294	67,442	805	176,791
50 años					
metaSPAdes	570,986,091	690,693	55,139	802	228,247
MEGAHIT	185,886,715	195,189	35,958	955	57,302
100 años					
metaSPAdes	568,911,333	690,534	152,874	789	225,629
MEGAHIT	479,497,398	554,094	114,981	830	171,730

Anexo A3. Concentración de metales en los suelos de estudio.

	Parcela	Cd (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
0 años	1	1.09	8.91	3.97	10.67	6.10	28.81
	2	1.02	9.44	3.51	9.72	6.04	27.87
	3	1.06	9.03	0.00	9.72	6.34	28.28
25 años	1	1.12	8.16	6.52	13.21	7.25	44.84
	2	1.30	8.54	10.20	14.88	7.80	53.78
	3	1.20	9.05	4.23	14.23	6.63	36.70
50 años	1	1.20	7.04	11.79	13.49	9.50	64.74
	2	1.24	7.13	11.58	13.42	8.82	65.19
	3	1.29	7.03	7.67	12.92	7.13	50.73
100 años	1	1.99	7.72	36.05	23.10	35.46	152.38
	2	2.08	7.86	32.32	21.39	31.11	138.14
	3	1.71	8.18	27.18	18.97	26.69	111.19

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Increases in the soil ammonia oxidizing phylotypes and their rechange due to long-term irrigation with wastewater

Eduardo J. Aguilar-Rangel[1], Alba Savin-Gámez[1], José Q. García-Maldonado[2], Blanca Prado[3], María Soledad Vásquez-Murrieta[4], Christina Siebe[3], Rocío J. Alcántara-Hernández[3]*

1 Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1˚ Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México, **2** Departamento de Recursos del Mar, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Merida 97310, Yucatán, México, **3** Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Del. Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México, **4** Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Del. Miguel Hidalgo, 11340, Ciudad de México, México

* ralcantarah@geologia.unam.mx, rocio.alcantara.h@gmail.com

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Aguilar-Rangel EJ, Savin-Gámez A, García-Maldonado JQ, Prado B, Vásquez-Murrieta MS, Siebe C, et al. (2024) Increases in the soil ammonia oxidizing phylotypes and their rechange due to long-term irrigation with wastewater. PLoS ONE 19(4): e0299518. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518

Editor: Zhe-Xue Quan, Fudan University, CHINA

Received: November 28, 2023

Accepted: February 13, 2024

Published: April 11, 2024

Copyright: © 2024 Aguilar-Rangel et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The physicochemical soil data can be found in Supporting Information File 1, while sequence raw data has been deposited in the NCBI database. The BioSample metadata is accessible in the NCBI BioSample database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample) under accession numbers SAMN28921204, SAMN28921205, SAMN28921206, and SAMN28921207 (BioProject PRJNA847174), and raw sequence data is available in the SRA-NCBI database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), with

Abstract

Wastewater irrigation is a common practice for agricultural systems in arid and semiarid zones, which can help to overcome water scarcity and contribute with nutrient inputs. Ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) are key in the transformation of NH_4^+-N in soil and can be affected by variations in soil pH, EC, N and C content, or accumulation of pollutants, derived from wastewater irrigation. The objective of this study was to determine the changes in the ammonia oxidizing communities in agricultural soils irrigated with wastewater for different periods of time (25, 50, and 100 years), and in rainfed soils (never irrigated). The *amoA* gene encoding for the catalytic subunit of the ammonia monooxygenase was used as molecular reporter; it was quantified by qPCR and sequenced by high throughput sequencing, and changes in the community composition were associated with the soil physicochemical characteristics. Soils irrigated with wastewater showed up to five times more the abundance of ammonia oxidizers (based on 16S rRNA gene relative abundance and *amoA* gene copies) than those under rainfed agriculture. While the *amoA*-AOA: *amoA*-AOB ratio decreased from 9.8 in rainfed soils to 1.6 in soils irrigated for 100 years, indicating a favoring environment for AOB rather than AOA. Further, the community structure of both AOA and AOB changed during wastewater irrigation compared to rainfed soils, mainly due to the abundance variation of certain phylotypes. Finally, the significant correlation between soil pH and the ammonia oxidizing community structure was confirmed, mainly for AOB; being the main environmental driver of the ammonia oxidizer community. Also, a calculated toxicity index based on metals concentrations showed a correlation with AOB communities, while the content of carbon and nitrogen was more associated with AOA communities. The results indicate that wastewater irrigation influence ammonia oxidizers communities, manly by the changes in the physicochemical environment.

corresponding accession numbers listed in Supporting Information File 2.

Funding: This work was funded by grants UNAM-PAPIIT IG101221 granted to Dra. Christina Siebe, and UNAM- PAPIIT IV200321to BL Prado.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Water scarcity has become a major concern of public policies around the globe. The 2030 Water Resources Group and the UN have forecasted shortfalls of nearly 40% of this resource by 2030 [1]. In arid and semiarid regions the problem is even worse, since less than 1000 m^3 of available water per capita per year is projected for 2050 [2]. In order to face the water crisis in these regions, many institutions are proposing to reuse reclaimed water or wastewater for urban, industrial and especially agricultural purposes [3].

Irrigation of crop fields with partially treated wastewater can satisfy not only water requirements, but also those of nutrients, since depending on the treatment degree it also supplies organic matter and reduced nitrogen forms (NH_4^+-N and organic-N) to the plants [4]. Nevertheless, the prolonged use of wastewater fosters the accumulation of pollutants such as metal (oid)s or xenobiotics in the soils [5, 6], and can affect the soil physicochemical characteristics, depending on the water quality. For example, when untreated wastewater is used, soil organic carbon, total nitrogen, phosphorous, salinity, sodicity and metal(oid)s concentrations increase over time [7, 8]. These soil physicochemical disturbances also induce changes in the microbial community and biogeochemical profile of the irrigated soils. Agricultural rainfed soils have shown a similar bacterial community structure to those in the nearby shrubland; while the communities in those irrigated with wastewater differs, with increasing abundance of Proteobacteria and Bacteroidetes [9]. The 16S rRNA gene-based predictions suggest changes in N-cycle process because of the introduction of wastewater in these soils, such as increases in the potential of denitrification, confirmed with activity assays [5]. However, the changes in the functional community structure of microorganisms involved in the N-cycle deserve more detailed attention, due to the environmental implications of excess in N-application to crops and the consequent pollution of groundwater or air, with nitrate leaching [10] or by N_2O emissions [11], respectively.

Reclaimed water or wastewater contains several N-forms (mainly NH_4^+ and organic N), and many soil prokaryotes associated to the N-cycle will be affected depending on the irrigation water quality. The microbial communities involved in the redox reactions of the N-cycle have shown to be sensible to pH changes, carbon and nitrogen sources and concentration, salinization or even contaminants. Ammonia oxidation is carried out by ammonia-oxidizing microorganisms (AOMs) and is a central step in the global nitrogen cycle. AOMs comprise Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB), Ammonia Oxidizing Archaea (AOA), Complete Ammonia Oxidizers (comammox), and Anaerobic Ammonia Oxidizing Bacteria AnAOB [12]. AOA and AOB are primordial in nitrification and in the N-cycle, and these groups are widely distributed in different niches but sensible to physicochemical variations, so they are considered as soil quality markers [13–15].

The relationships between the ammonia oxidizers and the environment have been widely studied. pH is considered to be one of the main drivers for ammonia oxidizer community composition: in some soils the presence and abundances of ammonia oxidizing archaea (AOA) such as *Nitrososphaera* and *Nitrosotalea* are associated with low pH values (pH ~4–6) [16, 17], while those of *Nitrosospira* (an ammonia oxidizing bacteria (AOB)) are associated with alkaline pH values [18, 19]. Also, AOA can grow autotrophically, while AOB are also able to grow mixotrophically or heterotrophically, as observed for *Nitrososphaera* and *Nitrosotalea* [20, 21], allowing them to compete in systems enriched with small concentrations of organic compounds. For example, in some studies, soil organic carbon contents correlate negatively with the size of the AOA community, while the AOB community has a greater ecophysiological diversity and covers a broader range of habitats [22]. The ammonia oxidizers also have shown response to different fertilization regimes, as the resistance and resilience observed in

AOA communities for organic amendments or in AOB communities after the application of inorganic N-fertilizers [23]. However, the dominance of *Nitrosospira* species such as *N. briensis*, who is known by its survival strategies in environments with fluctuating NH_4^+ environments, supports that some AOB can adapt to different niches [24]. In addition, the concentration of N-species is correlated to abundance and community structure of AOA and AOB. For example, at sites where ammonia is scarce (*e.g.*, oceans), AOA such as *Nitrosopumilus maritimus* tend to be more abundant, while some AOB as *Nitrosomonas* tend to be adapted to large concentrations of ammonia [25]; on the other hand, a negative effect of NO_3^- on AOA has been reported in soils [26]. Finally, pollutants also play a determinant role for ammonia oxidizer communities, where antibiotics can have a negative effect on AOB but not on AOA (36); and high zinc contents affected AOA while AOB showed a greater resilience [27].

In the current study, we evaluated the influence of prolonged wastewater irrigation on the ammonia-oxidizing microbial community of agricultural soils. The objective was to determine the changes in the community composition, abundance, and diversity of AOB and AOA in soils irrigated for 25, 50, and 100 years with wastewater irrigation, and to compare them with those of rainfed agricultural soils (0 years). The *amoA* gene from AOA and AOB was selected as a molecular marker for barcoding analysis, as this encodes for the catalytic domain of ammonia monooxygenase [28], and has been largely used as a genetic marker. Additionally, physicochemical soil properties were registered and associated with the changes in the ammonia oxidizer community. We hypothesize that wastewater irrigation will gradually change the physicochemical conditions of the soil and will impact the microbial community including ammonia oxidizers, boosting their abundance, and altering the native community structure.

Materials and methods

Site description

The studied area is located in the Mezquital Valley (MV), a semi-arid region in Central Mexico 60 km north of Mexico City. It is placed in the High Mexican Plateau at 1700–2100 m above sea level. The average annual temperature is around 18˚C, with a delimited rainy season from June to September with an average annual rainfall between 400 and 600 mm. The native xerophytic vegetation was substituted by an intensively managed agricultural system, where the main crops rotate between maize (*Zea mays*) and fodder crops like lucerne (*Medicago sativa*). The land-use change is a result of an irrigation scheme with untreated municipal wastewater from the Mexico City Metropolitan Area for several years.

The wastewater for irrigation is distributed through large open but mainly lined canals, and from these derived to the fields by secondary mainly unlined channels. Therefore, the agricultural area contains units with different age of irrigation depending on the date that the wastewater distribution net was constructed, generating an irrigation chronosequence scheme within the valley since this management started, more than a century ago [29]. Yet, some areas within the agricultural district are rainfed fields or freshwater irrigated crops using local wells [9]. Phaeozems are the dominant soils in the area, with the presence of Leptosols and Vertisols. These soils are in general neutral to slightly alkaline, where the wastewater irrigation process have favored the increases of soil organic matter stocks [30].

Some of the wastewater physicochemical characteristics and pollutants has been reported through time, yet this composition varies depending on the sampling date (S1 Table in S1 File). The pH values reported are from 6.7 to 8.9, an electrical conductivity (EC) of 930–2264 μS/cm, total organic carbon of 35–188 mg/L, and organic-N and NH_4^+ as main N forms, the presence of some metals and pharmaceuticals have been also determined. Wastewater

irrigation is performed by field overflow, where each field receives a mean of 10 irrigations per year, each one of about 200 mm.

Sampling and processing

To study the progressive effect of wastewater irrigation over ammonia oxidizers in agricultural soils, a chronosequence based on the irrigation time was established. Plots under this wastewater practice for 25, 50, and 100 years were selected, sampling three plots per irrigation interval, considering also three rainfed fields (0 years) as controls. The sampled soils were classified as Phaeozems, without crop cover at the sampling time, and collected in the Tula-03 irrigation district within a range of 16 km (S2 Table in S1 File). The rainfed site is managed under a traditional scheme with farmyard manure fertilization without information on the amount applied, where maize is cultivated once a year; the plots are at 2 km distance from the nearest fields recently irrigated with wastewater. The 25- and 50-years irrigated plots are at ~16 km distance from the control site, while the 100-years site is at 12 km from the rainfed site, and at 10 km from the 25- and 50-years irrigated plots. To ensure the representativeness of the site, the sampling design consisted of four equidistant longitudinal transects which were parallel to the irrigation channel, as it has been observed that pollutant concentration varies in parallel by the overflow irrigation process. Superficial bulk soil samples (0–10 cm) were collected with a corer (2.6 cm diameter) along each transect at 10 m distance, consisting of 25–33 cores per transect depending on the plot length. The soil cores collected at the four transects were mixed per plot, to obtain a composite sample per field (February 2020). The collected soil (0–10 cm) was deposited in sterile recipients and kept at 4˚C in darkness for transportation to the laboratory (5 h). The soils were then sieved with a 2 mm mesh to remove rocks and vegetal material, and homogenized to keep representative fresh soil samples, which were collected in 50-mL sterile conical tubes and preserved at -20˚C until DNA extraction. The remanent soil was processed for physicochemical characterization as mentioned below.

Physicochemical characterization

The samples were air dried in the darkness for 72 h and subsequently homogenized and again sieved with a metallic mesh (2 mm) and stored. pH, and electrical conductivity (EC) were determined in air dried samples following standard protocols based on Sparks *et al.* [31]. Soil pH and EC were measured in saturation extracts.

For elemental characterization soil samples were grounded to pass through a 0.180 mm sieve. Total C (TC) and N (TN) were determined with a 2400 Series II CHNS Elemental Analyzer (PerkinElmer) calibrated with the LECO CNS 2000 standard. Organic C (OC) was determined in sample aliquots after removal of carbonates using 5 N HCl. Metals such as Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn were measured in HNO_3-digested soil samples (Anton Paar Multiwave 3000 for 10 min) by ICP-OES (Perkin Elmer ICP-OES Optima 8300) [32].

DNA extraction and PCR

Total DNA was extracted from 0.25 g of previously processed soil samples using PowerSoil® DNA isolation Kit (Qiagen) according to manufacturer instructions. The obtained DNA was then quantified using a Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific) with a Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific) and stored at -20˚C for further analysis. Firstly, we employed a 16S rRNA gene amplicon sequencing approach to know the composition of the prokaryotic assemblages (Bacteria and Archaea) using the V4 region of the 16S rRNA gene with the primers 515F/806R (with a barcoded reverse primer, a MiSeq adaptors), following the

protocols of Caporaso et al. [33], the PCR conditions and amplification protocols can be consulted in Aguilar-Rangel *et al.* [34].

The *amoA* genes from AOA and AOB were amplified with the primers Arch-amoAF/Arch-amoAR [35] for AOA, and amoA-1F/ amoA-2R [36] for AOB. The primers contain additional specific MiSeq-tailed sequences. PCR reactions were 25 μL containing: template DNA (~15 ng per reaction), 1× PCR buffer (Mg^{2+} free), 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.4 μM of each primer, 200 μM of each deoxynucleotide triphosphate, dimethyl sulfoxide 5%, and 1 U of ExTaq DNA polymerase (Takara ExTaq) (Takara Bio Inc.). The amplification protocols consisted in i) an initial step of denaturation at 95˚C (5 min), followed by ii) 35 cycles of amplification including a denaturing step (95˚C, 1 min), an annealing step (specific for each primer set, 1 min) and an extending step (72˚C, 1 min), and iii) a final extension at 72˚C for 10 min. The annealing temperature of *amoA* of AOA was 53˚C and 60˚C for *amoA*-AOB. Dual indices were added to the amoA-amplicons with the Nextera XT Index Kit in a second PCR for eight cycles. Individual barcoded amplicons were diluted and purified in 10 mM Tris (pH 8.5) and pooled at 9 pM equimolar concentration.

Finally, the 16S rRNA amplicons were paired-end sequenced on an Illumina MiSeq platform at the Yale Center for Genome Analysis (CT, USA), while the *amoA* genes were single-end sequenced in a MiSeq platform with a MiSeq Reagent Kit V3 (2x250 cycles) at CINVESTAV-Mérida, Mexico.

Sequences analysis

The analysis of the 16S rRNA and *amoA* gene sequences was performed with the QIIME2 (2021.4) pipeline (https://qiime2.org) [37], using the parameters reported in Aguilar-Rangel *et al.* [34]. The sequences were classified with the Silva database as reference (silva-138-99-515-806-nb-classifier.qza, released in November 2020) (http://www.arb-silva.de).

The *amoA* raw sequences were demultiplexed using the "q2-demux" plugin and then their quality was verified (314,755 raw reads obtained). Sequence filtering was carried out by the DADA2 method (trimming at 250 pb) resulting in 300 representative sequences or ASVs (sequences with 100% nucleotide identity) obtained from 144,696 filtered, denoised and non-chimeric reads [38]. Then, these ASVs were collapsed using the "q2-vsearch" plugin to generate OTU at 95% of identity according to Yu *et al.* [39]. A manual data curation was performed to confirm that every OTU was associated with previously reported *amoA* genes and no pseudogenes with stop codons were present. The curated data were rarefacted using the "rarefy_even_depth" tool from package 'phyloseq' (in the R platform) to the minimum number of total counts per sample resulting in 1,446 counts per sample for AOA and 2,587 for AOB, to standardize the same number of counts (S1 Fig in S1 File). The *amoA* sequences were aligned using MUSCLE method from SEAVIEW software [40]. From the multiple alignments, a Neighbor-Joining tree supported by Jukes-Cantor distance method was built for alpha and beta-diversity analysis, and for taxonomic affiliation, a new Neighbor-Joining using the K2P distance method, and 1,000 replicates were built.

BioSample metadata is available in the NCBI BioSample database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/) under accession numbers SAMN28921204, SAMN28921205, SAMN28921206 and SAMN28921207 (BioProject PRJNA847174). Raw data sequence data is available in SRA-NCBI database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), with the accession numbers in the Supporting information material.

Gene quantification

The *amoA* genes from AOA and AOB were quantified using SYBR green technology using total DNA from each sample as template. The assays were performed employing a StepOne

Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific). A standard curve was built using serial dilutions of purified PCR products from extracted total DNA for each assay. Each reaction has a final volume of 10 μl and was prepared using 1× Premix Ex Taq Bulk (Takara Bio Inc.), 1× ROX Reference Dye, 0.2μmol/L of the forward and reverse primers and 1ng of template. The cycling program consists in one initial denaturing cycle at 95˚C (5min); and 40 amplification cycles [95˚C for 1min; an annealing temperature depending on the primer pair for 45 s, and 72˚C for 30s]. At the end of the program a melt curve was generated to verify the quality of the products and the assay (absence of primer dimers and amplification of only one band). The program for the melt curve is: an initial step was 95˚C for 15s, followed by a cycle of crescent temperature (+0.5˚C every 15s), starting at 60˚C and finalizing at 95˚C for every amplicon.

Statistical analysis

Diversity indexes calculation and principal coordinate analysis (PCoA) were performed using 'phyloseq' package from R (version 4.1.0). The PCoA analysis was supported by the weighted unifrac distance method. PERMANOVA test (999 permutations, paired) was implemented to found significant differences in community structure and their abundance using "betadisper" and "permutest" functions from the R package "vegan". Spearman and Mann-Whitney probes were realized in GraphPad Prism 6 to identify statistical significance for environmental and biological parameters.

Results

Soil physicochemical and microbiological characteristics

The soils at the sampled sites have been previously classified as vertic or haplic Phaeozems [41]. Duration of wastewater irrigation influenced the physicochemical characteristics of the top soil (Table 1), where most of the measured properties increased with irrigation time including pH, electrical conductivity (EC), total carbon content (TC), total nitrogen (TN) and organic carbon (OC). The pH did not show a significant change with time, but the average value increased from 7.70±0.06 in the rainfed soils, to ranges between 8.4–8.5 in the irrigated soils. EC, and concentrations of TC, TN and OC increase between sites irrigated for 25 years and 50 years reaching almost twice the concentrations observed in rainfed fields, while concentrations of TC, TN and OC in soils irrigated for 100 years do not differ from those measured in soils irrigated for 50 years.

The calculated toxicity index (TI) based on the equation proposed by Azarbad *et al.* [42], which is based on the metal concentration in the soil shows a progressive increase with duration of irrigation years, resulting in an almost 7-fold larger value in soils irrigated for 100 years in comparison with rain-fed soils. Mainly, the concentration of Cu, Ni, Pb and Zn increased through years peaking at 100 years (S3 Table in S1 File).

Table 1. Physicochemical characteristics of the sampled top soils.

Years	pH	EC (dS/m)	TC (%)	OC (%)	TN (%)	TI*
0	7.70 ± 0.06^{a}	0.68 ± 0.09^{a}	1.22 ± 0.09^{a}	1.17 ± 0.07^{a}	0.13 ± 0.01^{a}	375 ± 41^{a}
25	8.42 ± 0.04^{b}	1.95 ± 0.23^{b}	1.99 ± 0.41^{b}	1.82 ± 0.44^{ab}	0.20 ± 0.04^{ab}	587 ± 120^{a}
50	8.48 ± 0.03^{b}	2.36 ± 0.88^{b}	2.45 ± 0.27^{b}	2.18 ± 0.31^{b}	0.23 ± 0.02^{b}	764 ± 119^{a}
100	8.51 ± 0.11^{b}	1.42 ± 0.08^{ab}	2.26 ± 0.14^{b}	2.06 ± 0.22^{b}	0.24 ± 0.02^{b}	2164 ± 312^{b}

Different letters indicate significant differences among fields with different duration of irrigation ($p < 0.05$)

* TI (Toxicity index) was calculated based on Azarbad *et al.* [42]

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.t001

AOA and AOB abundance

Duration of wastewater irrigation affected the relative abundance of the prokaryotic communities associated with ammonia oxidation processes, here assessed by 16S rRNA and *amoA* genes. Firstly, the 16S rRNA gene survey showed that the relative abundance of AOA (Nitrososphaeria) increased from 6.86% in the rainfed soils, to 12–16% in the irrigated soils; while the potential AOB slightly increased from 1.16% in the rainfed soils, to 1.92% in the soils irrigated for 100 years (Fig 1).

The quantification of *amoA* genes confirmed this trend, where the number of *amoA*-AOA gene copies was highest in the soils irrigated for 50 years (7.27×10^6 *amoA* copies / g dry soil), followed by the soils irrigated for 25 and 100 years (Fig 2A). The *amoA*-AOB gene copies ranged from 1.11×10^6–2.13×10^6 *amoA* copies / g dry soil in the soils irrigated with wastewater, increasing significantly after 25 years under irrigation, and keeping a similar number of gene copies thereafter (Fig 2B). These gene counts indicate that AOA are more abundant than AOB in all the studied soil, but especially for the wastewater irrigated soils. The number of 16S rRNA gene copies also increased significantly in the irrigated samples, by almost one order of magnitude (Fig 2C). Therefore, to know the real increment in relation with the microbial biomass, ratios between *amoA* and 16S rRNA gene abundance were calculated. The number of

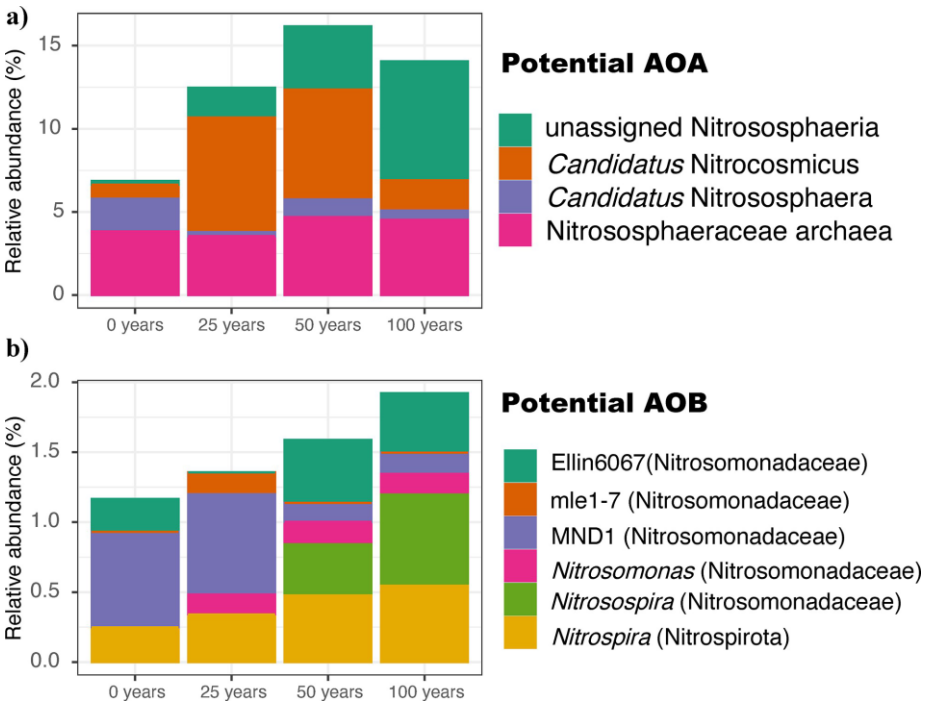

Fig 1. Relative abundance of potential ammonia oxidizers by a 16S rRNA gene survey. a) Potential AOA. b) Potential AOB.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g001

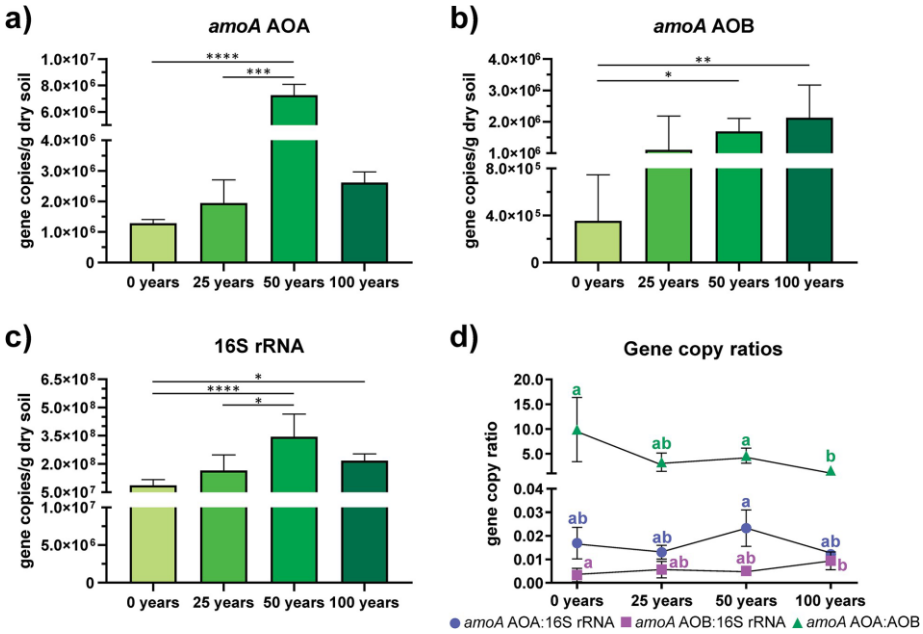

Fig 2. Quantification of *amoA* and 16S rRNA genes in the soil samples at different irrigation times. a) *amoA*-AOA gene. b) *amoA*-AOB gene. c) 16S rRNA gene. d) Gene copy ratios.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g002

archaeal *amoA* gene copies related to the 16S rRNA gene copies (*amoA* AOA:16S rRNA) do not vary through time, except for 50 years where the ratio was significantly larger (Fig 2D). While the changes in the *amoA* AOB:16S RNA ratio suggest a constant increase until 50 years but increasing significantly after 100 years. Further, the relation between AOA and AOB *amoA* genes showed a reduction in the relation to almost 1.6:1 copies of AOA over AOB during 100 years of irrigation (Fig 2D).

Ammonia-oxidizing community diversity and structure

The composition of the archaeal and bacterial ammonia-oxidizing communities was analyzed using the sequences of the *amoA* genes by Illumina MiSeq. The *amoA*-AOA gene sequences showed a higher number of ASVs (154 ASVs) than the *amoA*-AOB (112 ASVs). Nevertheless, the *amoA*-AOB sequences showed a higher diversity than its AOA counterpart, based on the Shannon index (Fig 3). For both groups, the detected diversity is significantly smaller (p-value < 0.05) in the soils irrigated for 25 years in comparison to the rainfed fields. Only for AOB, a gradual increase in the diversity of *amoA*-AOB genes can be noticed as duration of irrigation increases from 25 to 100 years (Fig 3).

The ammonia-oxidizing community structure also changed according to the duration of irrigation with wastewater based on the presence and abundance of the sequences (Fig 4). In the case of *amoA*-AOA communities, the use of wastewater for irrigation changed the

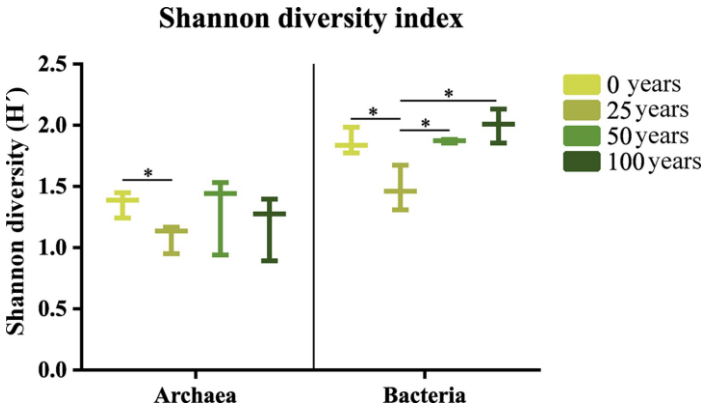

Fig 3. Shannon Diversity index (*H'*) based on *amoA*-AOA (left) and *amoA*-AOB sequences (right).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g003

community structure, separating the samples from rainfed fields from the irrigated samples in the ordination analysis (Fig 4A). A similar situation was found for the *amoA*-AOB communities (Fig 4B), where the rainfed and wastewater irrigated soils were separated between them, but not among the duration of irrigation (i.e., 25, 50 and 100 years), indicating that the structure of the community of ammonia oxidizers is similar in mid to long term irrigated soils. In general, it was observed that AOA communities from rainfed soils are significantly different from wastewater irrigated soils, and AOB are tending to be different but in a lesser degree (S4 Table in S1 File).

Taxonomic affiliation of the *amoA* gene sequences

The *amoA* gene sequences were collapsed in OTUs with 95% identity, resulting in 22 OTUs for AOA. Then, a phylogenetic tree was constructed to affiliate the sequences with other ones reported in databases. The archaeal *amoA* sequences were clustered within two groups related to the *Nitrososphaera* and *Nitrosocosmicus* genera (S2 Fig in S1 File). The *Nitrososphaera* group contained most of the sequences, representing >99% of the relative abundance of archaeal *amoA* genes found. This group was further divided into four subclusters, of which three were related to uncultured samples (subclusters I, II and IV), and one to *Nitrososphaera viennensis*, *Ca*. Nitrososphaera everglandensis and *Nitrososphaera gargensis* (subcluster III) (Fig 5A). The *Nitrososphaera* subclusters I, II, and III contained most of the phylotypes at all the irrigation conditions, and with no significant differences among them (Fig 5A). In contrast, the *Nitrososphaera* subcluster IV contained just one phylotype (<0.1% of relative abundance) (Fig 5B), which was found only in soils irrigated for 50 and 100 years with wastewater. Similarly, the *Nitrosocosmicus* subcluster I appeared in the irrigated soils (Fig 5C), at a low relative abundance (<0.3%) but was absent in the rainfed soils. Although no significant changes on these major archaeal groups belonging to *Nitrososphaera* were detected, it was possible to observe variations in their OTUs (S3 Fig in S1 File). For example, Arch1 and Arch5 seem to increase with the duration of wastewater irrigation, while Arch2 and Arch3 diminish, or are below the detection limits, as Arch7 and Arch9 (Fig 5D).

The 30 OTUs of ammonia oxidizing bacteria were separated in two groups associated with *Nitrosospira* and *Nitrosomonas*, being the first one the most abundant with 29 phylotypes and

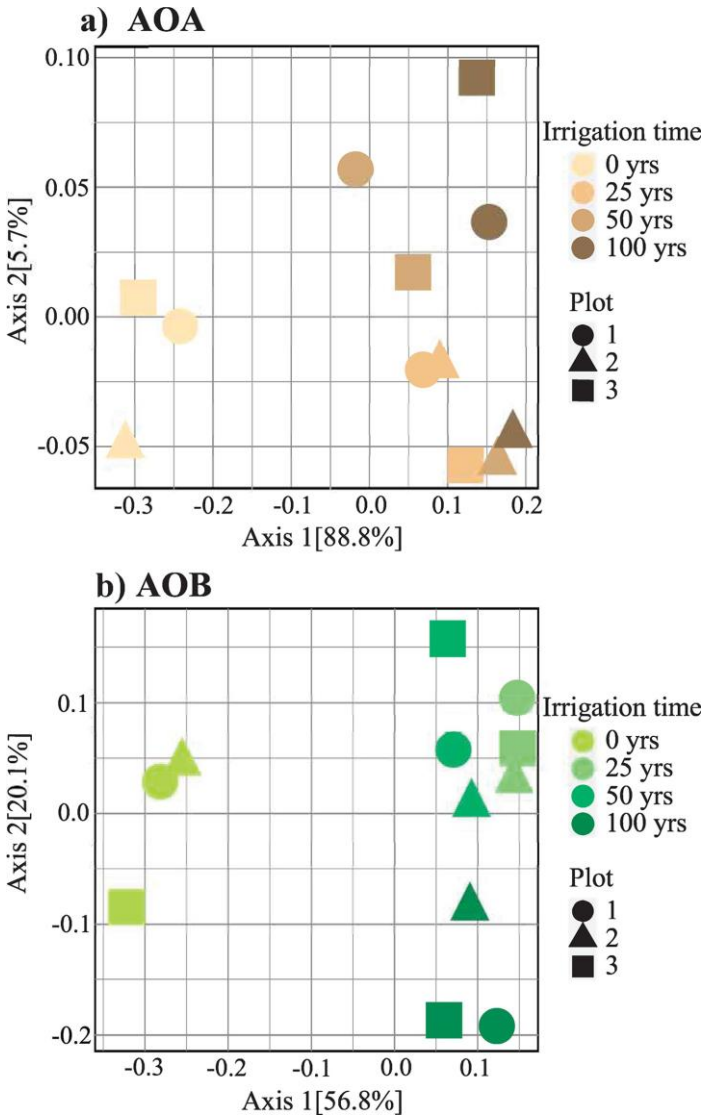

Fig 4. Community structure of ammonia oxidizers in soils irrigated with wastewater for 25, 50 and 100 years, and a rainfed irrigated soil (0 years). Weighted PCoA-UniFrac of a) AOA, and b) AOB, based on *amoA* sequences.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g004

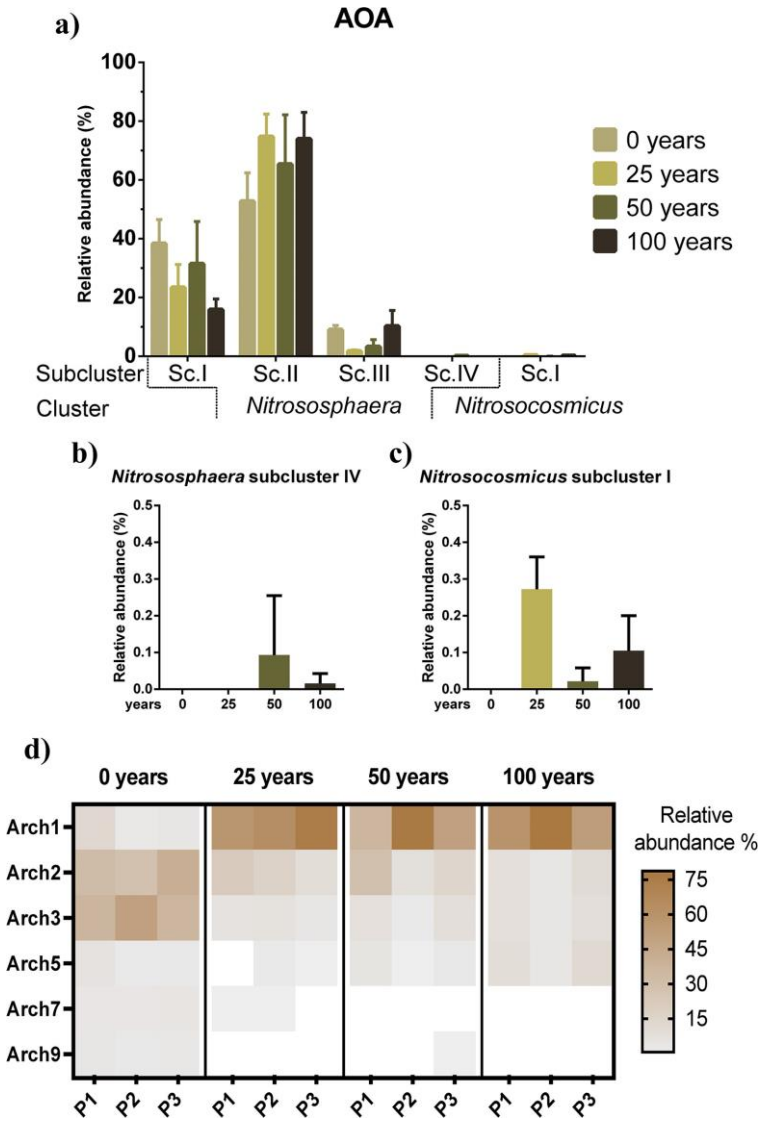

Fig 5. Relative abundance of archaeal *amoA* clusters and the detected OTUs based on their phylogenetical associations. a) Archaeal ammonia oxidizers groups; b) *Nitrososphaera* subcluster IV; c) *Nitrosocosmicus* subcluster I; d) heatmap from AOA representative OTUs. The identity of the OTUs is defined by the prefix Arch (*v.g.*, Arch1).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g005

representing >99% of the relative abundance (S4 Fig in S1 File). This *Nitrosospira* group was divided in four subclusters named according to the association with: *Nitrosospira* sp. NpAV and *Nitrosospira lacus* (subcluster I), *Nitrosovibrio* sp. Nv4 and *Nitrosospira multiformis* (subcluster II), environmental clones of *Nitrosospira* (subcluster III), and *Nitrosovibrio tenuis* and *Nitrosospira briensis* (subcluster IV). The *Nitrosospira* subclusters II, III and IV were found in all the irrigated fields representing most of the *amoA*-AOB sequences, with a relative abundance of 45, 49, and 5.4% in average, respectively; and did not differ significantly among fields irrigated for different length of time (Fig 6A). Though soils irrigated for 50 years show largest abundances in subcluster II, and decreasing abundances as irrigation length increases in subcluster III. The *Nitrosospira* subcluster I and the *Nitrosomonas* subcluster I only contained OTUs from the soils irrigated with wastewater, and with a maximum relative abundance of 2 and 1%, respectively (Fig 6B and 6C). The *Nitrosomonas* cluster only contained one OTU, closely related to *Nitrosomonas mobilis* and *Nitrosomonas stercoris*, and represented <0.6% of relative abundance in average (Fig 6C, S4 Fig in S1 File). Similar to Archaea, the bacterial *amoA*-OTUs also showed a differentiation by phylotype according to the duration of irrigation (S5 Fig in S1 File). The *Nitrosospira*-like OTUs such as, Bact1 and Bact9 presented a large increase in the wastewater irrigated soils with respect to rainfed soils, up to 185 and 19-times, respectively (Fig 6D), while other ones such as Bact8, Bact11 and Bact19, were only detected in irrigated soil. Bact5, Bact6, Bact12 and Bact16, tended to decrease as the soils are irrigated with wastewater or were not detected (Fig 6D).

Association of AOA and AOB with the soil physicochemical properties

Canonical correspondence analysis (CCA) was carried out to assess relations between the AOA and AOB community structures and their physicochemical soil environment, based on the *amoA* sequences. The *amoA*-AOA communities formed two clusters, one containing the communities found in rainfed soils, and one with the communities found in wastewater irrigated soils. The irrigated soils were significantly associated with properties such as pH, TN and the toxicity index (TI), the latter was particularly related with the soils irrigated for 100 years (Fig 7A). The *amoA*-AOB community presented three clusters consisting of: i) rainfed soils, ii) soils irrigated for 25 and 50 years, and iii) soils irrigated for 100 years (Fig 7B). The physicochemical properties explaining the observed grouping were those of the wastewater irrigated soils, similar to the observations found for the AOA community, where the soils irrigated for 100 years was closely correlated to the TI.

In addition, a Spearman correlation test was performed to analyze the correlation between the abundance and diversity of AOA and AOB, with the soil physicochemical characteristics (Fig 8). For diversity, there was no significant correlation between the Shannon index and the surveyed soil properties, although a correlation of 0.8 was found between the AOB *H'* and pH, TN and TI. The abundance of *amoA* gene copies did show positive significant correlations, where AOA was correlated with carbon forms (TC and OC), while AOB correlated with pH, TN and TI. In relation to the AO taxonomic affiliation, there was not a significant correlation between the different AOA groups with the environmental attributes; however, *Nitrososphaera* subcluster I stands out for a negative correlation between pH, TN and TI with a value of 0.8. In the case of AOB, *Nitrosospira*-subcluster I had a significant positive correlation with EC, besides a strong correlation with carbon sources (0.8), while the *Nitrosospira*-subcluster II correlated with carbon (TC and OC), and showed a strong positive correlation with pH and CE (of 0.8). Finally, *Nitrosospira*-subcluster III despite not showing significant correlations, there were negative robust ones with pH, TN and TI (Fig 8). Finally, at OTU level, there was a strong correlation with some of the physicochemical properties, without a clear tendency. For

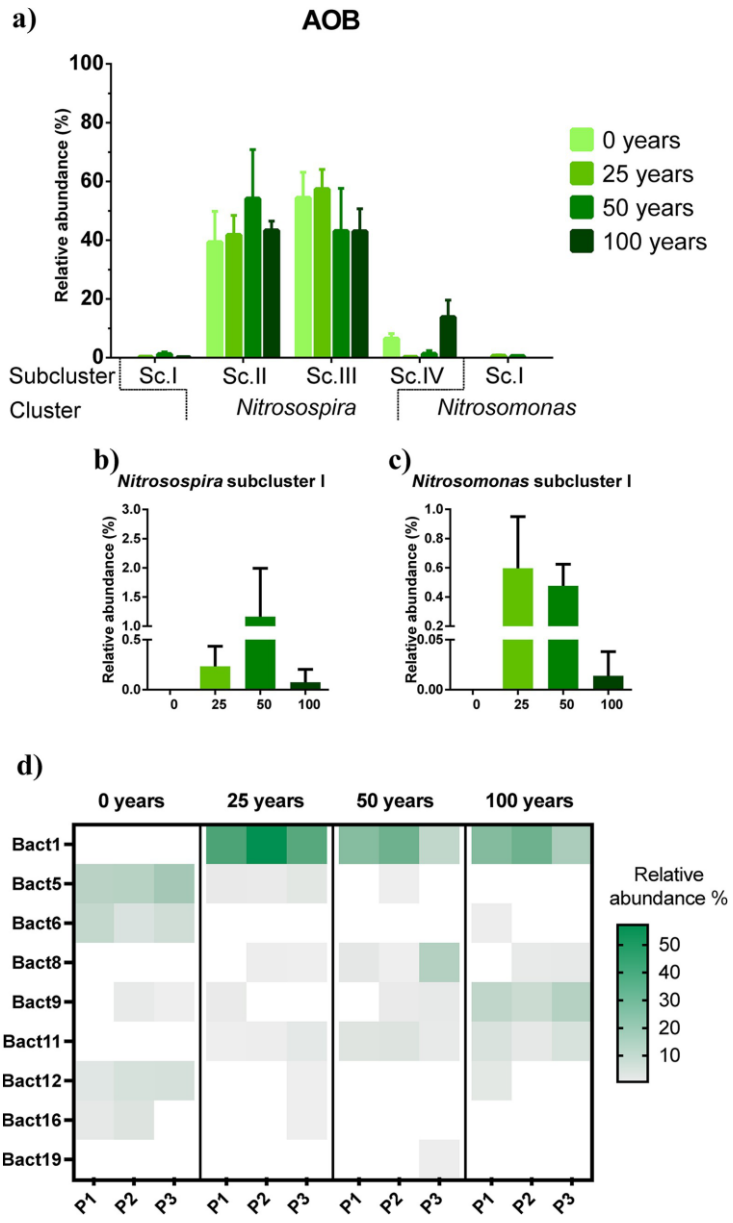
a)
AOB
Relative abundance (%)
100
80
60
40
20
0
0 years
25 years
50 years
100 years
Subcluster
Sc.I
Sc.II
Sc.III
Sc.IV
Sc.I
Cluster
Nitrosospira
Nitrosomonas
b)
Nitrosospira subcluster I
Relative abundance (%)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
25
50
100
c)
Nitrosomonas subcluster I
Relative abundance (%)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.05
0.00
0
25
50
100
d)
0 years
25 years
50 years
100 years
Bact1
Bact5
Bact6
Bact8
Bact9
Bact11
Bact12
Bact16
Bact19
P1
P2
P3
Relative abundance %
50
40
30
20
10

Fig 6. Relative abundances of bacterial *amoA* clusters and the detected OTUs based on their phylogenetical associations. a) Bacterial ammonia oxidizers groups; b) *Nitrosospira* subcluster I; c) *Nitrosomonas* subcluster I; d) heatmap from AOB representative OTUs. The identity of the OTUs is defined by the prefix Bact (*v.g.*, Bact1).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g006

AOA-OTUs, two phylotypes belonging to different *Nitrososphaera* subclusters presented a significative correlation (p values <0.05) with the concentration of soil carbon (TC and OC), one of them positive (Arch4), and another one negative (Arch.7). AOB phylotypes presented a similar behavior, since some OTUs significantly correlate positively with pH, TN and TI (Bact10 and Bact11), while one presented a negative correlation (Bact5) with these same soil characteristics (S5 Table in S1 File).

Discussion

Most of the microbiological studies on wastewater reuse in agriculture have monitored the innocuity and environmental risks of the cultivated crops [29], but only few studies have assessed the impacts on the soil microbial community [43, 44], and their potential biogeochemical profile. In the studied area, Friedel *et al.* [5] determined microbial biomass and respiration as well as some enzyme activities in topsoil samples irrigated for different length of time. While Broszat *et al.* [45] identify that wastewater irrigation increases the potential pathogens after the irrigation for 100 years, and Lüneberg *et al.* [9] showed the changes in the structure and functionality of the bacterial. In this study, we considered to survey a microbiological key functional soil group, such as the ammonia oxidizers after continuous irrigation for 100 years with organic N compounds and ammonia contained in wastewater, cycling the excess of N compounds in the agrosystem. These communities showed changes in their number, composition, and taxonomic affiliation, which can be related to long term changes in some of the soil's properties, as here showed.

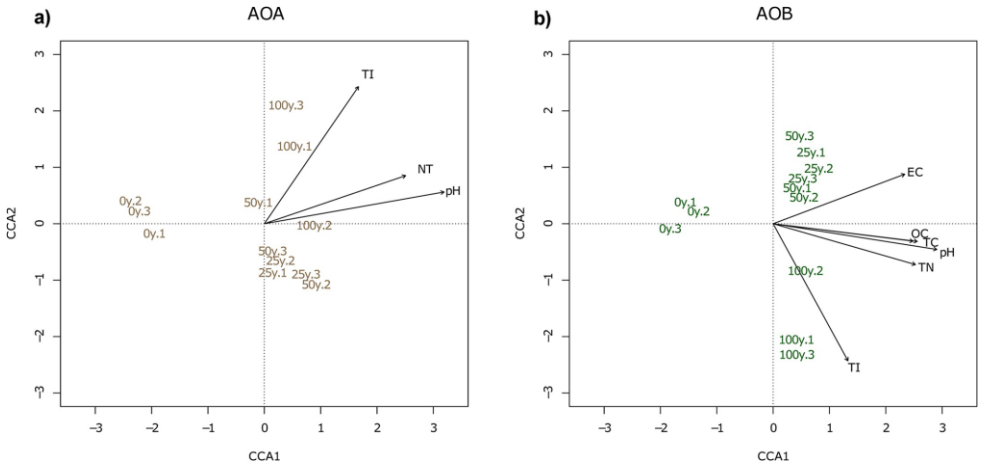

Fig 7. Canonical Correlation Analyses (CCA) of the ammonia oxidizing communities and their significant correlations with the soil physicochemical characteristics. a) for AOA; and b) for AOB. The nomenclature of all samples corresponds to irrigated years and the number of the sampled plot (*v.g.*, 0y.1).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g007

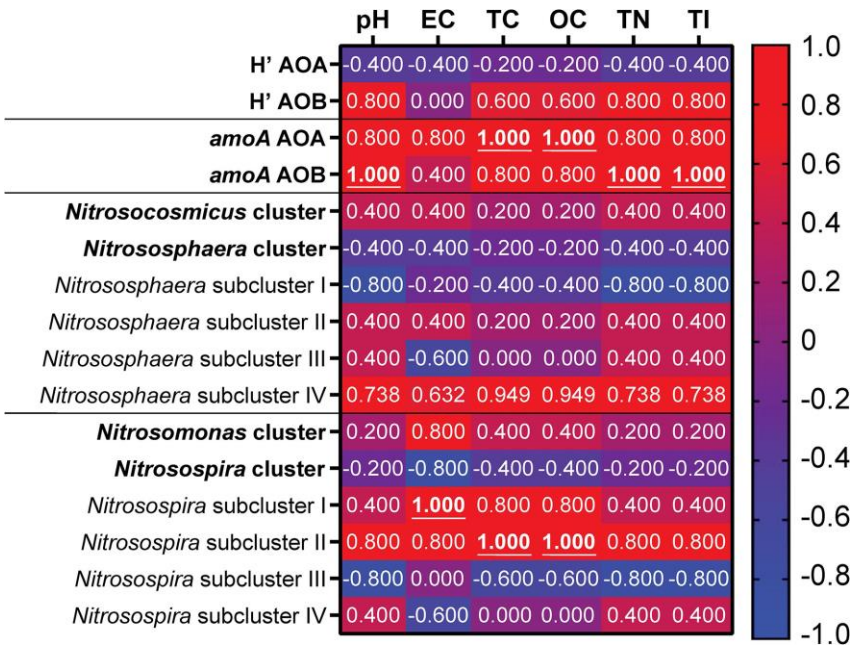

Fig 8. Heatmap with the Spearman correlation among physicochemical soil properties and ammonia oxidizing groups in the studied soils. Underlined numbers represent those with p-values < 0.05.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299518.g008

Municipal wastewater from Mexico City has been increasingly used for irrigation of agricultural fields over the last century. Previous studies based on functional predictions suggest that processes such as nitrification can be increased due to irrigation with wastewater, in comparison to the use of freshwater from local wells [9]. This trend was also found with the 16S rRNA gene survey here done where the relative abundance of potential ammonia oxidizers increased with irrigation time in the long term (Fig 1), and then confirmed with the increase of *amoA* absolute counts with length of irrigation (Fig 2). The gene abundance of *amoA* is generally used as estimator of the amount of ammonia oxidizers in a system, and therefore their variations can be indicators of environmental changes. AOA abundance doubles in soils irrigated for 100 years, from 1.28×10^6 to 2.61×10^6 *amoA* copies per gram of dry soil, showing similar values to those found in grassland soils contaminated with metals for 80 years, or even paddy soils exposed to wastewater irrigation [46, 47]. However, it is notable that the *amoA*-AOA abundance peaks in soils irrigated for 50 years, and it is correlated with the increase in carbon forms (TC and OC). This assumption is attributed to the mixotroph lifestyle of some AOA, as some have the capability to assimilate organic carbon [48, 49].

Ibekwe *et al.* [44] reported that the use of treated wastewater did not influence the microbial diversity in comparison with freshwater irrigated soils in an agricultural experiment station, but the 16S rRNA gene sequences related to N-cycling groups such as nitrifying, nitrogen-fixing and denitrifying bacteria, increased their abundance when treated wastewater was used

instead of freshwater. In this study, a similar result was observed using *amoA* genes, where we did not observe significant changes on AOA and AOB diversity through time determined by the Shannon diversity index (Fig 3); but the relative and absolute abundance of ammonia oxidizers increased in soils irrigated for long time with wastewater compared to the rainfed soils. Further, by sequencing these *amoA* genes, we detect a change on AOA and AOB community structure, where the samples of the rainfed sites were different from those irrigated with wastewater, and with no significant differences according to duration of irrigation (i.e., 25, 50 and 100 years) (Fig 4).

To date, there is not enough information about the direct influence of the use of raw wastewater to irrigate agricultural soils over the ammonia oxidizing community, nonetheless, fertilization experiments could be considered an analogous approach since wastewater is similar to an organic fertilization [8]. Previous reports have suggested that AOA and AOB respond differently to external stimuli such as N-fertilization [48, 50]. For example, the community structure of AOA has been reported as generally unaffected by fertilizer addition in forest soils in the long-term [51], yet Chen *et al.* [52] showed changes in the community changes in acid paddy soils. Our results showed that AOA community structure was different in the rainfed soils compared to the wastewater irrigated ones; suggesting that soil characteristics and management could be key to understand how archaeal ammonia oxidizers adapt to soil environmental changes.

AOB community structure is presumably more sensitive to fertilizer input in the short-term and long-term [51, 53]. Wertz *et al.* [51] found that periodic fertilization over forest acid soils increased potential AOB, with a significant correlation with nitrate concentration. While Wu *et al.* [53] results indicate that fertilization during 22 years on paddy soils modified AOB community structure in relation to non-fertilized plots, besides the bacterial *amoA* gene counts increases almost 50 times after the constant fertilization with urea and organic matter (rice straw). In this study, gradual changes in the AOB community structure were detected but in a gradual scale, where the AOB community of the rainfed soil was different from that in the wastewater irrigated ones, and among them, the irrigated for 25–50 years cluster in a different group than irrigated for 100 years. Furthermore, an increase of almost one order of magnitude were detected in the *amoA* gene copies from AOB on soils irrigated by 100 years with wastewater in relation with rainfed soils.

On behalf of the *amoA* AOA sequences, we distinguished the two most common archaeal groups from soil, *Nitrososphaera* and *Nitrosocosmicus* [54]. *Ca*. Nitrososphaera spp. was the most dominant cluster in the studied soils as was expected, since it is recognized as the more abundant AOA in soils, particularly in those with agricultural managements [55, 56]. Previous studies in arable soils have demonstrated changes in subcluster composition of a *Nitrososphaera* cluster, depending on variations on climatical conditions such as temperature or precipitation [57]. However, Habteselassie *et al.* [58] have not found differences between archaeal *amoA* sequence clustering in soil under different fertilization regimes. In concordance with this study, the current survey also did not find significant differences in the abundance of the *Nitrososphaera* subclusters according to duration of irrigation; however, it was possible to detect the following tendencies. *Nitrososphaera* subcluster I, that grouped uncultured representatives from superficial agricultural soils, showed a diminution in their relative abundance after 100 years irrigation compared to the rainfed soil, which could be attributed to the diminution of the prevalent phylotype Arch2, associated to an uncultured archaeon from agricultural soil. While *Nitrososphaera* subcluster II, which is associated with uncultured strains from paddy and restored crop soils, was the most abundant one in all the sampled soils, mainly due to the presence of the phylotype Arch1. This *Nitrososphaera* subcluster increased slightly in wastewater irrigated soils, though the conforming OTUs showed diverse behaviors, the most

abundant phylotype (Arch1) augmented up to 9 times in the irrigated soils, while Arch3 had a lower abundance in irrigated soils than in rainfed ones. Phylotype Arch3 was closely related to a clone from a restored farm soil of a semiarid region [59], therefore, its presence and abundance might be negatively affected by intensive agricultural management. The *Nitrososphaera* subcluster III abundance was surprisingly low as expected, since it contains *amoA* sequences that belong to the widespread *Nitrososphaera* subcluster 1.1 [60]. The other widespread genus from terrestrial AOA is *Ca*. Nitrososocosmicus [61] was also detected, nevertheless their affiliated sequences only were found in soils irrigated with wastewater, which is consistent with their proximity with *Nitrosocosmicus franklandus*, an ureolitic and high-ammonia tolerant archaea whose ideal growth conditions are at pH values of 7.5 [62].

Bacterial *amoA* sequences are associated with *Nitrosospira*, which has been reported as the most dominant bacterial ammonia oxidizer genus in soil, and *Nitrosomonas* which is less common [58]. The *Nitrosomonas* cluster is only present after wastewater irrigation; this genus is a common representative of agricultural soils irrigated with wastewater effluents [63], yet only one OTU is associated (Bact15). This OTU is closely related to *Nitrosomonas stercoris*, an AOB that tolerates high concentrations of ammonium, isolated from composted cattle manure, and found in wastewater and wastewater treatment plants [64]; thus, OTU Bact15 could be introduced by the wastewater used for irrigation. Finally, it is worth to notice that the 16S rRNA gene survey suggests a larger proportion of potential AOB belonging to *Nitrosomonas*, therefore there could be a methodological bias by primer coverage [65], so further studies must continue to verify the relevance of *Nitrosomonas* in soils under wastewater irrigation.

The *Nitrosospira* cluster was dominant in the studied soils and was divided into four subclusters, where the abundance of these subclusters they did not change significantly during the different irrigation lengths, comparably to the trend observed in the AOA *Ca*. Nitrososphaera cluster. Subcluster I was only detected on wastewater irrigated soils and it was closely related to a previously established cluster, which includes *Nitrosospira* species from water-saturated or moisture-rich soils [66], being consistent with the irrigation techniques used on the Mezquital Valley. The mean abundance of subcluster II increased during irrigation years, which can be related to bacteria such as *Nitrosospira multiformis* found in fertilized agricultural soils [67], or *Nitrosovibrio* sp. Nv4 whose main habitat is wastewater [68] and possibly adapted to the constant irrigation by water of this quality. In this subcluster, Bact2 and Bact4 are dominant as was expected by its proper ubiquitous distribution on agricultural soils according to its phylogenetical relation with *N. multiformis* and isolates from agricultural soils derived from alluvial deposits respectively [69, 70]. The subcluster III was the other dominant group, containing different uncultured *Nitrosospira* and which showed a diminution of nearly 10% in the mean abundance at 50 and 100 years. Regardless that this subcluster has a similar abundance in rainfed soil and in soil irrigated for 25 years, their OTU content varies, since in rainfed soil it is dominated by Bact5 and then is substituted by Bact1 after 25 years of irrigation, a close phylotype related to an isolate from riparian soils. This phylotype replacement is continuously found through the years in the wastewater irrigated soils, possibly due to environmental adaptations as Bact1 its closely related to an isolate from a riparian zone, which is known to be enriched with nutrients and pollutants [71]. Furthermore, other abundant phylotypes were exclusively in the rainfed soils such as Bact6 and Bact16, which were affiliated to sequences from restored agricultural soils and river isolates, respectively, both systems with a similar nitrogen input and a circumneutral pH [59, 72]. Finally, the *Nitrosospira* subcluster IV was present in all studied irrigation samples as expected by their association with uncultured soil strains with positive effects of N fertilization, and *Nitrosovibrio tenuis* Nv1 [73].

As we observed, pH is a primary driver in the determination of the niche of the ammonia oxidizers. Previous studies in agricultural soils irrigated with wastewater have measured a

short-term drop in pH between 0.2–0.7 units at short-term (after 3 hours of wastewater irrigation) [10], as well as in the long-term between 0.3–3.5 units [74, 75]. Nonetheless, our results registered a gradual increase of pH as duration of irrigation proceeds and particularly in comparison with rainfed soils, as other author have described previously, particularly in agricultural soils [76] or in soils close to unprotected wastewater ponds and enriched with N-compounds by deposition [77]. This pH increase could be attributed to a high Na_2CaCO_3 concentration of soils due to salinization caused by the input of salts by the wastewater salts input [78]. A similar effect could be observed in EC possibly due to the salts introduced by wastewater, whose main ions have shown to be Na^+, Cl^- and HCO_3^- [34]. The peak of EC in soil saturation extracts was after 50 years of irrigation with 2.36 dS/m, considered as very slight saline and therefore, it can influence the microbiota in a minor way [79]. The increase in EC by wastewater irrigation has been also found in agricultural soils treated with olive mill wastewater [80], by the constant input of different ions for two years. In the Mezquital Valley soils, this increase in EC has been also found due to the water quality used for irrigation [9], and in Mollic Vertisols and Eutric Leptosols irrigated with untreated wastewater for different lengths of time (between 0 and 80 years) [5]. In this study, the soils from fields irrigated for 50 and 100 years showed an increased content of OC, TC, and TN up to 86%, as observed on agricultural soils irrigated with reclaimed wastewater [81]. The here observed gradual increase of soil TN tended to a saturation asymptote, while TC and OC peaked after 50 years under irrigation possibly due to the dynamic equilibrium between mineralization and humification, that results from an increase in primary productivity [30]. Additionally, previous studies in the zone found that rainfed agricultural soil have smallest OC stock in comparison with soil irrigated for 40 years with wastewater irrigated soils (which are 1.5 times higher), as well as the quality of the organic matter changing from hydrophobic to hydrophilic compounds such as cellulose and lignin (with modified structure) [30]. TI was calculated from the concentration of total metals in the soil and indicates the accumulation of pollutants with duration of irrigation. The index increased with irrigation length, since municipal wastewater used for irrigation contains trace concentrations of these potentially toxic elements [6]. Previous studies in the zone have confirmed that continuous irrigation leads to the accumulation of metals such as Hg, Cr, As or Pb, especially in the superficial soil layer [82].

Long term wastewater irrigation has changed soil quality in Mezquital Valley affecting several characteristics that include, variations in soil pH, the increase of CE and C and N stocks, and the input of pollutants. All these changes influence the structure community of ammonia oxidizers, particularly by the specific niches of these microorganisms [49, 83]. The use of wastewater for irrigation was determinant in the establishment of AOA and AOB, due to the N-inputs, and the settled community of both groups are well adapted the current physicochemical environment. Nevertheless, our results suggest that AOB tend to be favored by the conditions generated by the use of wastewater in comparison with AOA.

The changes in the ammonia oxidizing communities seem to be linked to the changes in the soil characteristics depending on the ammonia oxidizers groups and phylotypes. For example, as was expected AOA abundance significantly correlates with TC and OC probably by their suggested mixotroph lifestyle [49], considering that prior studies have found that AOA could uptake organic carbon sources coming from the wastewater [48]. Nevertheless, despite the advantages that confer mixotrophy to AOA, their abundance could be limited by the raising metal pollution, the increment of pH or the disadvantaged competence with AOB, due to the high input of ammonia from wastewater irrigation [25, 84]. The number gene copies of *amoA*-AOB in rainfed soils here studied was barely lower than those in not impacted soils [85], but this number gradually increased up to 10-fold in the long term irrigated soils reaching a number similar to agricultural soils after irrigation with reclaimed wastewater [86]. It should

be emphasized that the AOB abundance in the community is significantly higher in long term irrigated crop fields than in the rainfed soil, probably by the accumulative input of reduced N-forms and soil pH values which confer selective advantages to the AOB [18]. This finding is supported by the AOA:AOB ratio, though AOA is more abundant in these kind of soils–and as expected–[83], the AOA:AOB ratio decreases progressively as the duration of irrigation with wastewater goes on. The diminution of the ratio has been previously described in soils exposed to industrial waste effluents [87], and it was accompanied by an increase in pH, TC, TN, OC and the accumulation of pollutants of different nature, such as metals and aromatic hydrocarbons, as here found. In conformity with our results, the AOB abundance correlates positively with pH, TN and TI, which is calculated using the concentration of metals in the soil. Particularly, it was observed the effect of metals over ammonia oxidizing communities. High Zn concentrations in alkaline crop soils have significant effect over AOA and AOB abundance, while Cu at 50 mg/kg concentration does not have significant effect over AOB but AOA [88]. Other studies have confirmed a positive correlation between Cu, Co, Ni, Cd, Pb and Zn over *Nitrospira* and *Nitrosomonas*, and negative over AOA and *Nitrosospira*, this last is contrary to our results were *Nitrosospira* is dominant [89]. Yet, these results also suggested that the response to environmental changes is different for each AOA or AOB phylotype, indicating that the functional responses to environmental alterations for our studied sites are phylotype-specific.

Conclusions

Wastewater irrigation represents a good strategy for zones with water scarcity, yet it is relevant to know the effects of this practice in the long term, considering N-cycling microbial groups that are related to soil biogeochemistry. In this study, the ammonia oxidizing communities showed changes correlated with the physicochemical characteristic of the soils in response to wastewater irrigation, such as carbon concentration, pH, EC and the content of accumulable pollutants (TI). After 100 years of irrigation with wastewater, it was observed that archaeal and bacterial ammonia oxidizers abundance and community structure changed. Nevertheless, despite the ammonia oxidizer core persist through time, new phylotypes were detected which seemed to be better adapted to the changing conditions of the soil; the abundance of AOB over AOA can be favored by the environmental conditions produced by wastewater irrigation until reaching an equilibrium. This suggest that these soil systems should be monitored further, especially when new management practices are considered such as changing the water quality of the irrigation by treating it in wastewater treatment plants that use chloride to diminish the presence of potential pathogens, besides considering other soil types within the agricultural district. These new investigations must be carried out to clarify the effect over other N-related groups such as nitrite oxidizing bacteria or denitrifiers.

Supporting information

S1 File. Tables (S1 to S5 Tables) and figures (S1 to S5 Figs).
(DOCX)

S2 File. The accession numbers for the raw sequence database.
(XLSX)

S1 Graphical abstract.
(TIF)

Acknowledgments

This paper is part of the requirements for obtaining a Doctoral degree at the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, the student Eduardo Javier Aguilar Rangel has received a scholarship from CONAHCyT (775174). The authors thank Mario Cayetano Salazar, Maricarmen Salazar Ledesma, Javier Tadeo Leon, L. Mora-Palomino, Abril Gamboa and Iris Suárez for their valuable technical support. We acknowledge the infrastructure of the National Laboratory "Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía", LANGEM. The authors also thank the support given by the families Cornejo-Oviedo from Las Palmas Ranch for access to the sampling and monitoring areas. E. J. Aguilar-Rangel and A. Savin-Gámez received a graduate scholarship from CONAHCYT.

Author Contributions

Conceptualization: Eduardo J. Aguilar-Rangel, Blanca Prado, María Soledad Vásquez-Murrieta, Christina Siebe, Rocío J. Alcántara-Hernández.

Data curation: Eduardo J. Aguilar-Rangel, Alba Savin-Gámez, José Q. García-Maldonado.

Formal analysis: Eduardo J. Aguilar-Rangel.

Funding acquisition: Blanca Prado, Christina Siebe.

Investigation: Eduardo J. Aguilar-Rangel, José Q. García-Maldonado, Blanca Prado, María Soledad Vásquez-Murrieta, Christina Siebe, Rocío J. Alcántara-Hernández.

Methodology: Eduardo J. Aguilar-Rangel, Alba Savin-Gámez, José Q. García-Maldonado, María Soledad Vásquez-Murrieta.

Resources: Rocío J. Alcántara-Hernández.

Supervision: Rocío J. Alcántara-Hernández.

Writing – original draft: Eduardo J. Aguilar-Rangel, Alba Savin-Gámez, José Q. García-Maldonado, Blanca Prado, María Soledad Vásquez-Murrieta, Christina Siebe, Rocío J. Alcántara-Hernández.

Writing – review & editing: Eduardo J. Aguilar-Rangel, Alba Savin-Gámez, José Q. García-Maldonado, Blanca Prado, María Soledad Vásquez-Murrieta, Christina Siebe, Rocío J. Alcántara-Hernández.

References

1. Biswas AK, Tortajada C. Water crisis and water wars: myths and realities. International Journal of Water Resources Development. 2019; 35(5): 727–31. https://doi.org/10.1080/07900627.2019.1636502
2. Rijsberman FR. Water scarcity: Fact or fiction? Agricultural Water Management. 2006; 80(1): 5–22. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.07.001
3. Bahri A. Agricultural reuse of wastewater and global water management. Water Science and Technology. 1999; 40(4): 339–46. https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00516-8
4. Ungureanu N, Vlăduț V, Voicu G. Water scarcity and wastewater reuse in crop irrigation. Sustainability [Internet]. 2020; 12(21).
5. Friedel JK, Langer T, Siebe C, Stahr K. Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. Biology and Fertility of Soils. 2000; 31(5): 414–21. https://doi.org/10.1007/s003749900188
6. Siebe C. Heavy metal availability to plants in soils irrigated with wastewater from Mexico City. Water Science and Technology. 1995; 32(12): 29–34. https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00135-7

7. Cajuste LJ, Carrillo RG, Cota EG, Laird RJ. The distribution of metals from wastewater in the Mexican Valley of Mezquital. Water, Air, and Soil Pollution. 1991; 57(1): 763–71. https://doi.org/10.1007/BF00282940

8. Kiziloglu FM, Turan M, Sahin U, Kuslu Y, Dursun A. Effects of untreated and treated wastewater irrigation on some chemical properties of cauliflower (*Brassica olerecea* L. var. botrytis) and red cabbage (*Brassica olerecea* L. var. rubra) grown on calcareous soil in Turkey. Agricultural Water Management. 2008; 95(6): 716–24. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.01.008

9. Lüneberg K, Schneider D, Siebe C, Daniel R. Drylands soil bacterial community is affected by land use change and different irrigation practices in the Mezquital Valley, Mexico. Scientific Reports. 2018; 8(1): 1413. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19743-x PMID: 29362388

10. Hernández-Martínez JL, Prado B, Cayetano-Salazar M, Bischoff W-A, Siebe C. Ammonium-nitrate dynamics in the critical zone during single irrigation events with untreated sewage effluents. Journal of Soils and Sediments. 2018; 18(2): 467–80. https://doi.org/10.1007/s11368-016-1506-2

11. González-Méndez B, Webster R, Fiedler S, Loza-Reyes E, Hernández JM, Ruíz-Suárez LG, et al. Short-term emissions of CO_2 and N_2O in response to periodic flood irrigation with waste water in the Mezquital Valley of Mexico. Atmospheric Environment. 2015; 101: 116–24. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.10.048

12. Zhao W, Bi X, Bai M, Wang Y. Research advances of ammonia oxidation microorganisms in wastewater: metabolic characteristics, microbial community, influencing factors and process applications. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2023; 46(5): 621–33. https://doi.org/10.1007/s00449-023-02866-5 PMID: 36988685

13. Hu J, Li D, Liu Q, Tao Y, He X, Wang X, et al. Effect of organic carbon on nitriffication efficiency and community composition of nitrifying bioffilms. Journal of Environmental Sciences. 2009; 21(3): 387–94. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62281-0

14. Martikainen PJ. Nitrification in forest soil of different pH as affected by urea, ammonium sulphate and potassium sulphate. Soil Biology and Biochemistry. 1985; 17(3): 363–7. https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90074-4

15. Yin C, Tan C, Chen H, Ye M, Fan X, Zheng W, et al. Insight into the role of competition in niche differentiation between ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ammonium-rich alkaline soil: A network-based study. Soil Biology and Biochemistry. 2022; 168: 108638. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108638

16. Jz He, Jp Shen, Lm Zhang, Yg Zhu, Ym Zheng, Mg Xu, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. Environmental Microbiology. 2007; 9(9): 2364–74. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01358.x PMID: 17686032

17. Zhang L-M, Hu H-W, Shen J-P, He J-Z. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. The ISME Journal. 2012; 6(5): 1032–45. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.168 PMID: 22134644

18. He L, Bi Y, Zhao J, Pittelkow CM, Zhao X, Wang S, et al. Population and community structure shifts of ammonia oxidizers after four-year successive biochar application to agricultural acidic and alkaline soils. Science of The Total Environment. 2018; 619–620: 1105–15. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.029 PMID: 29734589

19. Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environmental Microbiology. 2008; 10(11): 2966–78. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x PMID: 18707610

20. Herbold CW, Lehtovirta-Morley LE, Jung M-Y, Jehmlich N, Hausmann B, Han P, et al. Ammonia-oxidising archaea living at low pH: Insights from comparative genomics. Environmental Microbiology. 2017; 19(12): 4939–52. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13971 PMID: 29098760

21. Tourna M, Stieglmeier M, Spang A, Könneke M, Schintlmeister A, Urich T, et al. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011; 108(20): 8420–5. https://doi.org/10.1073/pnas.1013488108

22. Wessén E, Nyberg K, Jansson JK, Hallin S. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. Applied Soil Ecology. 2010; 45(3): 193–200. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.003

23. Tao R, Li J, Hu B, Chu G. Ammonia-oxidizing bacteria are sensitive and not resilient to organic amendment and nitrapyrin disturbances, but ammonia-oxidizing archaea are resistant. Geoderma. 2021; 384: 114814. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114814

24. Mitsuta A, Ishige N, Tatsumi C, Musavi Madegwa Y, Eurya Kuramae E, Uchida Y. Stability of ammonia oxidizer communities upon nitrogen fertilizer pulse disturbances is dependent on diversity. Geoderma. 2023; 439: 116685. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2023.116685

25. Verhamme DT, Prosser JI, Nicol GW. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. The ISME Journal. 2011; 5(6): 1067–71. Epub 20110113. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.191 PMID: 21228892 PMCID: PMC3131854

26. Ying J, Li X, Wang N, Lan Z, He J, Bai Y. Contrasting effects of nitrogen forms and soil pH on ammonia oxidizing microorganisms and their responses to long-term nitrogen fertilization in a typical steppe ecosystem. Soil Biology and Biochemistry. 2017; 107: 10–8. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.023

27. DeVries SL, Zhang P. Antibiotics and the terrestrial Nitrogen cycle: a review. Current Pollution Reports. 2016; 2(1): 51–67. https://doi.org/10.1007/s40726-016-0027-3

28. Lehtovirta-Morley LE. Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. FEMS Microbiology Letters. 2018; 365(9): fny058. https://doi.org/10.1093/femsle/fny058 PMID: 29668934

29. Jiménez B. Treatment technology and standards for agricultural wastewater reuse: a case study in Mexico. Irrigation and Drainage. 2005; 54(S1): S23–S33. https://doi.org/10.1002/ird.183

30. Sánchez–González A, Chapela–Lara M, Germán–Venegas E, Fuentes-García R, Río-Portilla Fd, Siebe C. Changes in quality and quantity of soil organic matter stocks resulting from wastewater irrigation in formerly forested land. Geoderma. 2017; 306: 99–107. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.07.009

31. Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH. Methods of soil analysis, part 3: Chemical methods: John Wiley & Sons; 2020.

32. Santillán J, López-Martínez R, Aguilar-Rangel EJ, Hernández-García K, Vásquez-Murrieta MS, Cram S, et al. Microbial diversity and physicochemical characteristics of tropical karst soils in the northeastern Yucatan peninsula, Mexico. Applied Soil Ecology. 2021; 165: 103969. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103969

33. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. The ISME journal. 2012; 6 (8): 1621–4. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8 PMID: 22402401

34. Aguilar-Rangel EJ, Prado BL, Vásquez-Murrieta MS, los Santos PE-d, Siebe C, Falcón LI, et al. Temporal analysis of the microbial communities in a nitrate-contaminated aquifer and the co-occurrence of anammox, n-damo and nitrous-oxide reducing bacteria. Journal of Contaminant Hydrology. 2020; 234: 103657. https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2020.103657 PMID: 32777591

35. Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005; 102(41): 14683–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0506625102 PMID: 16186488

36. Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. Applied and environmental microbiology. 1997; 63(12): 4704–12. https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997 PMID: 9406389 PMCID: PMC168793

37. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology. 2019; 37 (8): 852–7. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9 PMID: 31341288

38. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature methods. 2016; 13(7): 581–3. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869 PMID: 27214047

39. Yu S, Yao P, Liu J, Zhao B, Zhang G, Zhao M, et al. Diversity, abundance, and niche differentiation of ammonia-oxidizing prokaryotes in mud deposits of the Eastern China marginal seas. Frontiers in Microbiology. 2016; 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00137

40. Gouy M, Guindon Sp, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular Biology and Evolution. 2010; 27(2): 221–4. https://doi.org/10.1093/molbev/msp259

41. IUSS W. World reference base for soil resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports. 2015; 106.

42. Azarbad H, Niklińska M, van Gestel CAM, van Straalen NM, Röling WFM, Laskowski R. Microbial community structure and functioning along metal pollution gradients. Environmental Toxicology and Chemistry. 2013; 32(9): 1992–2002. https://doi.org/10.1002/etc.2269 PMID: 23637098

43. Dang Q, Tan W, Zhao X, Li D, Li Y, Yang T, et al. Linking the response of soil microbial community structure in soils to long-term wastewater irrigation and soil depth. Science of The Total Environment. 2019; 688: 26–36. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.138 PMID: 31233911

44. Ibekwe AM, Gonzalez-Rubio A, Suarez DL. Impact of treated wastewater for irrigation on soil microbial communities. Science of The Total Environment. 2018; 622–623: 1603–10. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.039 PMID: 29054620

45. Broszat M, Nacke H, Blasi R, Siebe C, Huebner J, Daniel R, et al. Wastewater Irrigation Increases the abundance of potentially harmful Gammaproteobacteria in soils in Mezquital Valley, Mexico. Applied and Environmental Microbiology. 2014; 80(17): 5282–91. https://doi.org/10.1128/AEM.01295-14 PMID: 24951788

46. Li M, Xue L, Zhou B, Duan J, He Z, Wang X, et al. Effects of domestic sewage from different sources on greenhouse gas emission and related microorganisms in straw-returning paddy fields. Science of The Total Environment. 2020; 718: 137407–. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137407 PMID: 32105919

47. Mertens J, Wakelin SA, Broos K, McLaughlin MJ, Smolders E. Extent of copper tolerance and consequences for functional stability of the ammonia-oxidizing community in long-term copper-contaminated soils. Environmental Toxicology and Chemistry. 2010; 29(1): 27–37. https://doi.org/10.1002/etc.16 PMID: 20821416

48. Jia Z, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. Environmental Microbiology. 2009; 11(7): 1658–71. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01891.x PMID: 19236445

49. Sun R, Myrold DD, Wang D, Guo X, Chu H. AOA and AOB communities respond differently to changes of soil pH under long-term fertilization. Soil Ecology Letters. 2019; 1(3–4): 126–35. https://doi.org/10.1007/s42832-019-0016-8

50. Jp Shen, Lm Zhang, Yg Zhu, Jb Zhang, Jz He. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. Environmental Microbiology. 2008; 10(6): 1601–11. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01578.x PMID: 18336563

51. Wertz S, Leigh AKK, Grayston SJ. Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. FEMS Microbiology Ecology. 2012; 79(1): 142–54. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01204.x PMID: 22066501

52. Chen X, Zhang L-M, Shen J-P, Wei W-X, He J-Z. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. Biology and Fertility of Soils. 2011; 47(3): 323–31. https://doi.org/10.1007/s00374-011-0542-8

53. Wu Y, Lu L, Wang B, Lin X, Zhu J, Cai Z, et al. Long-term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in a paddy soil. Soil Science Society of America Journal. 2011; 75(4): 1431–9. https://doi.org/10.2136/sssaj2010.0434

54. Huang L, Chakrabarti S, Cooper J, Perez A, John SM, Daroub SH, et al. Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil. ISME Communications. 2021; 1(1): 19–. https://doi.org/10.1038/s43705-021-00020-4 PMID: 37938645

55. Staley C, Breuillin-Sessoms F, Wang P, Kaiser T, Venterea RT, Sadowsky MJ. Urea Amendment Decreases Microbial Diversity and Selects for Specific Nitrifying Strains in Eight Contrasting Agricultural Soils. Frontiers in Microbiology. 2018; 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00634

56. Zhalnina K, de Quadros PD, Gano KA, Davis-Richardson A, Fagen JR, Brown CT, et al. *Ca*. Nitrososphaera and *Bradyrhizobium* are inversely correlated and related to agricultural practices in long-term field experiments. Frontiers in Microbiology. 2013; 4. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00104

57. Jiang H, Huang L, Deng Y, Wang S, Zhou Y, Liu L, et al. Latitudinal distribution of ammonia-oxidizing Bacteria and Archaea in the agricultural soils of Eastern China. Applied and Environmental Microbiology. 2014; 80(18): 5593–602. https://doi.org/10.1128/AEM.01617-14 PMID: 25002421

58. Habteselassie MY, Xu L, Norton JM. Ammonia-oxidizer communities in an agricultural soil treated with contrasting nitrogen sources. Frontiers in Microbiology. 2013; 4. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00326

59. Chen Z, Wu W, Shao X, Li L, Guo Y, Ding G. Shifts in abundance and diversity of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea associated with land restoration in a semi-arid ecosystem. PLOS ONE. 2015; 10(7): e0132879–e. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132879 PMID: 26172994

60. Pester M, Rattei T, Flechl S, Gröngröft A, Richter A, Overmann J, et al. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. Environmental Microbiology. 2012; 14(2): 525–39. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02666.x

61. Clark IM, Hughes DJ, Fu Q, Abadie M, Hirsch PR. Metagenomic approaches reveal differences in genetic diversity and relative abundance of nitrifying bacteria and archaea in contrasting soils. Scientific Reports. 2021; 11(1): 15905–. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95100-9 PMID: 34354121

62. Lehtovirta-Morley LE, Ross J, Hink L, Weber EB, Gubry-Rangin C, Thion C, et al. Isolation of ' *Candidatus* Nitrosocosmicus franklandus', a novel ureolytic soil archaeal ammonia oxidiser with tolerance to high ammonia concentration. FEMS Microbiology Ecology. 2016; 92(5): fiw057–fiw. https://doi.org/10.1093/femsec/fiw057

63. Oved T, Shaviv A, Goldrath T, Mandelbaum RT, Minz D. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. Applied and Environmental Microbiology. 2001; 67(8): 3426–33. https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3426-3433.2001 PMID: 11472914

64. Nakagawa T, Tsuchiya Y, Takahashi R. Whole-genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas stercoris* type strain KYUHI-S, isolated from composted cattle manure. Microbiology Resource Announcements. 2019; 8(34). https://doi.org/10.1128/MRA.00742-19

65. Orschler L, Agrawal S, Lackner S. Lost in translation: the quest for *Nitrosomonas* cluster 7-specific *amoA* primers and TaqMan probes. Microbial Biotechnology. 2020; 13(6): 2069–76. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13627

66. Urakawa H, Garcia JC, Nielsen JL, Le VQ, Kozlowski JA, Stein LY, et al. *Nitrosospira lacus* sp. nov., a psychrotolerant, ammonia-oxidizing bacterium from sandy lake sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2015; 65(Pt_1): 242–50. https://doi.org/10.1099/ijs.0.070789-0

67. Ouyang Y, Norton JM. Nitrite oxidizer activity and community are more responsive than their abundance to ammonium-based fertilizer in an agricultural soil. Frontiers in Microbiology. 2020; 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01736

68. Elling FJ, Evans TW, Nathan V, Hemingway JD, Kharbush JJ, Bayer B, et al. Marine and terrestrial nitrifying bacteria are sources of diverse bacteriohopanepolyols. Geobiology. 2022; 20(3): 399–420. https://doi.org/10.1111/gbi.12484 PMID: 35060273

69. Norton JM, Klotz MG, Stein LY, Arp DJ, Bottomley PJ, Chain PSG, et al. Complete genome sequence of *Nitrosospira multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. Applied and Environmental Microbiology. 2008; 74(11): 3559–72. https://doi.org/10.1128/AEM.02722-07

70. Wang Q, Zhang L-M, Shen J-P, Du S, Han L-L, He J-Z. Effects of dicyandiamide and acetylene on N2O emissions and ammonia oxidizers in a fluvo-aquic soil applied with urea. Environmental Science and Pollution Research. 2016; 23(22): 23023–33. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7519-y PMID: 27581050

71. Aguiar TR Jr, Rasera K, Parron LM, Brito AG, Ferreira MT. Nutrient removal effectiveness by riparian buffer zones in rural temperate watersheds: The impact of no-till crops practices. Agricultural Water Management. 2015; 149: 74–80. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.10.031

72. Zhang S, Xia X, Li S, Zhang L, Wang G, Li M, et al. Ammonia oxidizers in high-elevation rivers of the Qinghai-Tibet Plateau display distinctive distribution patterns. Applied and Environmental Microbiology. 2019; 85(22). https://doi.org/10.1128/AEM.01701-19 PMID: 31519662

73. Krümmel A, Harms H. Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. Archives of Microbiology. 1982; 133(1): 50–4. https://doi.org/10.1007/BF00943769

74. Aharonov-Nadborny R, Tsechansky L, Raviv M, Graber ER. Mechanisms governing the leaching of soil metals as a result of disposal of olive mill wastewater on agricultural soils. Science of The Total Environment. 2018; 630: 1115–23. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.270 PMID: 29554733

75. Alnaimy MA, Shahin SA, Vranayova Z, Zelenakova M, Abdel-Hamed EMW. Long-Term impact of wastewater irrigation on soil pollution and degradation: a case study from Egypt. Water. 2021; 13(16): 2245–. https://doi.org/10.3390/w13162245

76. Abd-Elwahed MS. Effect of long-term wastewater irrigation on the quality of alluvial soil for agricultural sustainability. Annals of Agricultural Sciences. 2019; 64(2): 151–60. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2019.10.003

77. Kavvadias V, Elaiopoulos K, Theocharopoulos S, Soupios P. Fate of potential contaminants due to disposal of olive mill wastewaters in unprotected evaporation ponds. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2017; 98(3): 323–30. https://doi.org/10.1007/s00128-016-1922-4 PMID: 27663444

78. Flores L, Blas G, Hernández G, Alcalá R. Distribution and sequential extraction of some heavy metals from soils irrigated with wastewater from Mexico City. Water, Air, and Soil Pollution. 1997; 98(1–2): 105–17. https://doi.org/10.1007/BF02128652

79. Azabdaftari A, Sunar F. Soil salinity mapping using multitemporal landsat data. The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences. 2016; XLI-B7: 3–9. https://doi.org/10.5194/isprs-archives-XLI-B7-3-2016

80. Belaqziz M, El-Abbassi A, Lakhal EK, Agrafioti E, Galanakis CM. Agronomic application of olive mill wastewater: Effects on maize production and soil properties. Journal of Environmental Management. 2016; 171: 158–65. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.006 PMID: 26899012

81. Xu J, Wu L, Chang AC, Zhang Y. Impact of long-term reclaimed wastewater irrigation on agricultural soils: A preliminary assessment. Journal of Hazardous Materials. 2010; 183(1–3): 780–6. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.094 PMID: 20719431

82. Guédron S, Duwig C, Prado BL, Point D, Flores MG, Siebe C. (Methyl)mercury, arsenic, and lead contamination of the world's largest wastewater irrigation system: the Mezquital Valley (Hidalgo State—Mexico). Water, Air, & Soil Pollution. 2014; 225(8): 2045–. https://doi.org/10.1007/s11270-014-2045-3

83. Xu A, Li L, Xie J, Gopalakrishnan S, Zhang R, Luo Z, et al. Changes in ammonia-oxidizing archaea and bacterial communities and soil nitrogen dynamics in response to long-term nitrogen fertilization. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2022; 19(5): 2732–. https://doi.org/10.3390/ijerph19052732 PMID: 35270425

84. Liu J, Cao W, Jiang H, Cui J, Shi C, Qiao X, et al. Impact of heavy metal pollution on ammonia oxidizers in soils in the vicinity of a Tailings Dam, Baotou, China. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2018; 101(1): 110–6. https://doi.org/10.1007/s00128-018-2345-1 PMID: 29744521

85. Vela-Cano M, Gómez-Brandón M, Pesciaroli C, Insam H, González-López J. Study of total bacteria and ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea in response to irrigation with sewage sludge compost tea in agricultural soil. Compost Science & Utilization. 2018; 26(3): 145–55. https://doi.org/10.1080/1065657X.2018.1432429

86. Li B, Cao Y, Guan X, Li Y, Hao Z, Hu W, et al. Microbial assessments of soil with a 40-year history of reclaimed wastewater irrigation. Science of The Total Environment. 2019; 651: 696–705. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.193 PMID: 30245425

87. Subrahmanyam G, Shen J-P, Liu Y-R, Archana G, He J-Z. Response of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to long-term industrial effluent-polluted soils, Gujarat, Western India. Environmental Monitoring and Assessment. 2014; 186(7): 4037–50. https://doi.org/10.1007/s10661-014-3678-9 PMID: 24554021

88. Tang Q, Xia L, Ti C, Zhou W, Fountain L, Shan J, et al. Oxytetracycline, copper, and zinc effects on nitrification processes and microbial activity in two soil types. Food and Energy Security. 2020; 9(4): e248. https://doi.org/10.1002/fes3.248

89. Zhang L, Guan Y, Jiang SC. Investigations of soil autotrophic ammonia oxidizers in farmlands through genetics and big data analysis. Science of the Total Environment. 2021; 777: 146091. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146091