



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto de la contaminación de cadmio y zinc en la diversidad bacteriana del suelo

Margarita María Sarria Carabalí

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Coordinación de Posgrados
Palmira, Colombia
2018

Efecto de la contaminación de cadmio y zinc en la diversidad bacteriana del suelo

Margarita María Sarria Carabalí

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Ciencias Agrarias

Directores:

Ph.D. Nguyen Esmeralda López Lozano

Ph.D. Luis Enrique Cortés Páez

Línea de Investigación:

Manejo de Suelos y Aguas

Grupo de Investigación:

Uso y manejo de suelos y aguas con énfasis en degradación de suelos.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Coordinación de Posgrados

Palmira, Colombia

2018

(Dedicatoria)

A mis padres

“La contaminación nunca debería ser el precio de la prosperidad.-”.

Al Gore

Agradecimientos

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

- A Dios...
- A la Doctora Nguyen Esmeralda López del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica de San Luis Potosí, México (IPICYT), por darme la oportunidad de trabajar con ella y brindarme su apoyo y colaboración en el desarrollo de este proyecto académico.
- Al Doctor Luis Enrique Cortés Páez de la Universidad Nacional de Colombia, por su constante motivación y colaboración en este proceso académico.
- A los maestros Juan Pablo Rodas, Dulce Partida, Guillermo Vidriales y Elizabeth Cortés y a todo el personal técnico por la colaboración brindada en los laboratorios del IPICYT.
- Al maestro Rodrigo Velázquez-Duran y al Doctor Felipe García Oliva del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al ingeniero Ángel de Jesús Estrada González y al Doctor Joel Flores por su colaboración en el uso del Mini-PAM.
- Al grupo de investigación en Uso y manejo de suelos y aguas con énfasis en degradación de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Resumen

El Cd y el Zn son metales de interés debido a su alta biodisponibilidad ambiental y toxicidad, razones por las cuales se debe prestar atención a su efecto en las comunidades bacterianas del suelo, que son responsables de la fertilidad del suelo y de brindar servicios ecosistémicos, así como a la relación planta – bacteria – metal. Por lo anterior, se determinó el efecto del Cd y del Zn en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas de un suelo (molisol) cultivado con *Echinocactus platyacanthus*. El suelo fue caracterizado fisicoquímicamente (textura, humedad, pH, CE, carbono total, carbonato de calcio, carbono orgánico, amonio, nitrato, CIC, macronutrientes, micronutrientes, Cd y Zn total, soluble y biodisponible, P total y disponible, S soluble y N total) y dispuesto en macetas con plantas de *Echinocactus platyacanthus*. Luego, se les aplicaron tres concentraciones de Cd⁺² y de Zn⁺², de manera individual y por triplicado, según los niveles de referencia para suelos agrícolas de México y Estados Unidos. Se dispusieron en invernadero durante 30 días, y se les realizó una nueva caracterización química. La determinación de la estructura y diversidad bacteriana, antes y después de la contaminación, se realizó en el suelo de la rizosfera, para lo cual se extrajo el ADN y se secuenció la región V4 del gen 16S rRNA en equipo de Illumina Miseq 2x300 pb. Se cuantificó la abundancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno por amplificación del gen *nifH* en qPCR. El carbono de la biomasa microbiana se determinó por el método de fumigación / extracción. El efecto de la contaminación de Cd y Zn en *E. platyacanthus* se evaluó mediante la fluorescencia de la clorofila, con un MINI-PAM. El análisis bioinformático se realizó en Mothur (versión 1.35.1), los heatmaps en R v. 34.0, y los análisis estadísticos en SPSS v. 22.0. El efecto negativo y significativo del Cd sobre la diversidad bacteriana y la eficiencia fotosintética de *E. platyacanthus*, así como su efecto positivo sobre la biomasa microbiana, pudo deberse tanto a la interacción planta-bacteria-metal, que influye positivamente en el incremento de la tolerancia al estrés ambiental ocasionado por este metal, como a la biodisponibilidad del mismo. La contaminación con Zn afectó negativamente la riqueza y la diversidad bacteriana del suelo, y *E. platyacanthus* no mostró estrés, infiriéndose que existe una resistencia y/o tolerancia a los niveles aplicados de este metal.

Palabras clave: nivel de referencia, diazótrofes, carbono microbiano, eficiencia fotosintética, absorción.

Abstract

Cd and Zn are metals of interest due to their high environmental bioavailability and toxicity, reasons attention should be due to their effect on soil bacterial communities, which are responsible for soil fertility and for providing ecosystem services, as well as the plant - bacteria - metal relationship. Therefore, the effect of Cd and Zn on the structure and diversity of the bacterial communities of a soil (molisol) cultivated with *Echinocactus platyacanthus* was determined. The soil was characterized physicochemically (texture, humidity, pH, EC, total carbon, calcium carbonate, organic carbon, ammonium, nitrate, CEC, macronutrients, micronutrients, total, soluble and bioavailable Cd and Zn, total and available P, soluble S and total N) and arranged in pots with *Echinocactus platyacanthus* plants. Then, were applied three concentrations of Cd⁺² and Zn⁺², individually and in triplicate, according to the reference levels for agricultural soils of Mexico and the United States. These ones were dispose in a greenhouse for 30 days, and underwent a new chemical characterization. The determination of bacterial structure and diversity, before and after contamination, was carried out in the rhizosphere soil, for which the DNA was extracted and the V4 region of the 16S rRNA gene were sequenced in Illumina Miseq 2x300 pb equipment. The abundance of nitrogen-fixing bacteria was quantify by amplification of the *nifH* gene in qPCR. The carbon of the microbial biomass was determine by the fumigation / extraction method. The effect of contamination of Cd and Zn in *E. platyacanthus* was assess by chlorophyll fluorescence with MINI-PAM. The bioinformatic analysis was perform in Mothur (version 1.35.1), the heatmaps in R v. 34.0, and the statistical analyzes in SPSS v. 23.0. The negative and significant effect of the Cd on the bacterial diversity and the photosynthetic efficiency of *E. platyacanthus*, as well as its positive effect on the microbial biomass, could have been due to the plant-bacteria-metal interaction, which positively influences the increase of the tolerance to environmental stress caused by this metal, as well as its bioavailability. Zn contamination negatively affected the soil's richness and bacterial diversity, and *E. platyacanthus* showed no stress, inferring that there is a resistance and / or tolerance to the applied levels of this metal.

Keywords: *Reference level, diazotrophs, microbial carbon, photosynthetic efficiency, absorption.*

Contenido

	Pág.
Introducción.....	1
1 Justificación	5
2 Objetivo.....	7
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3 Marco Teórico.....	9
3.1 Definición de suelo	9
3.2 Contaminación del suelo.....	10
3.2.1 Contaminación del suelo por metales pesados	11
3.2.2 Criterios para declarar un suelo contaminado por metales pesados....	12
3.3 Biodisponibilidad de metales pesados	14
3.4 Impactos de los metales pesados en la comunidad bacteriana.....	15
3.4.1 Interacción metal pesado – bacteria.....	17
3.4.2 Sistemas de resistencia bacteriana ante la contaminación por metales pesados 18	18
3.4.3 Interacción planta – bacteria	23
4 Materiales y Métodos	29
4.1 Localización.....	29
4.2 Muestreo de suelos	29
4.3 Caracterización de los suelos	30
4.4 Conformación de mesocosmos y descripción de las muestras.	31
4.5 Adición de metales pesados a los suelos.....	32
4.6 Análisis químico de los suelos contaminados con Cd y Zn	33
4.7 Caracterización de la comunidad bacteriana.	34
4.7.1 Muestreo de Suelo de la rizosfera	34
4.7.2 Extracción de ADN.....	34
4.7.3 Pruebas de calidad – PCR	35
4.7.4 Secuenciación.....	35
4.7.5 Determinación de la diversidad bacteriana.....	36
4.8 Cuantificación de comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno.	38
4.9 Determinación de Biomasa Microbiana.....	38
4.9.1 Carbono microbiano.....	39
4.10 Evaluación de la fluorescencia de la clorofila	40
4.11 Diseño experimental	41
4.12 Análisis de datos.....	42
6 Resultados.....	43
6.1 Análisis fisicoquímicos del suelo no contaminado.....	43
6.2 Propiedades químicas del suelo contaminado	44
6.3 Efecto de Cd en la diversidad y estructura bacteriana del suelo.	46
6.3.1 Diversidad y riqueza bacteriana en suelos contaminados con Cd	46
6.3.2 Composición y estructura bacteriana en suelos contaminados con Cd.	49

6.4	Efecto del Cd en las bacterias del suelo fijadoras de Nitrógeno.	52
6.5	Efecto de Cd en la biomasa microbiana del suelo.	54
6.6	Efecto de Cd en <i>Echinocactus platyacanthus</i>	56
6.6.1	Fluorescencia de la clorofila de <i>Echinocactus platyacanthus</i>	56
6.6.2	Absorción de Cd en <i>Echinocactus platyacanthus</i>	59
6.7	Efecto de Zn en la diversidad y estructura bacteriana del suelo.	63
6.7.1	Diversidad y riqueza bacteriana en suelos contaminados con Zn 63	
6.7.2	Composición y estructura bacteriana en suelos contaminados con Zn.	66
6.8	Efecto del Zn en las bacterias del suelo fijadoras de Nitrógeno.	69
6.9	Efecto de Zn en la biomasa microbiana del suelo.	70
6.10	Efecto de Zn en <i>Echinocactus platyacanthus</i>	73
6.10.1	Eficiencia fotosintética de <i>Echinocactus platyacanthus</i>	73
6.10.2	Absorción de Zn en <i>Echinocactus platyacanthus</i>	74
7	Discusión	79
7.1	Efecto de Cd en la diversidad y estructura bacteriana del suelo.	79
7.2	Efecto del Cd en las bacterias del suelo fijadoras de Nitrógeno.	81
7.3	Efecto de Cd en la biomasa microbiana del suelo.	82
7.4	Efecto de Cd en <i>Echinocactus platyacanthus</i>	83
7.5	Efecto de Zn en la diversidad y estructura bacteriana del suelo.	84
7.6	Efecto del Zn en las bacterias del suelo fijadoras de Nitrógeno.	85
7.7	Efecto de Zn en la biomasa microbiana del suelo.	86
7.8	Efecto de Zn en <i>Echinocactus platyacanthus</i>	86
8	Conclusiones	88
	ANEXOS	90
	Bibliografía	97

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama de los diferentes procesos que involucran la interacción bacteria-metal	19
Figura 2. Mecanismos de control de la biodisponibilidad de metales pesados en la rizosfera.	24
Figura 3. Efectos de la asociación entre raíces vegetales y bacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) en presencia de metales pesados.	24
Figura 4. Localización de la zona de estudio	29
Figura 5. Etapas de preparación de librerías metagenómicas	36
Figura 6. Conducción del análisis metagenómico.	37
Figura 7. Correlograma de propiedades químicas del suelo contaminado basado en datos de correlación de Spearman (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).	45
Figura 8. Curvas de rarefacción de los tratamientos no contaminados (1) y contaminados con Cd (2). Las curvas representan el promedio de las tres réplicas de cada tratamiento. Los OTUs fueron establecidos al 97% de identidad.....	46
Figura 9. Promedio de índices de Shannon para tratamientos no contaminados (Periodo 1) y contaminados con Cd (Periodo 2).	48
Figura 10. Modelos de regresión de índice de Shannon versus concentraciones de Cd total (CdT), Cd soluble (CdW) y Cd biodisponible (CdE).	49
Figura 11. Heatmap de composición relativa bacteriana a nivel de Phyla de los tratamientos en estudio (>1% de presencia).....	50
Figura 12. Heatmap de composición relativa bacteriana a nivel de Genero de los tratamientos en estudio (porcentaje >2% de presencia).	51

-
- Figura 13.** Correlograma de bacterias a nivel de genero vs propiedades químicas del suelo basado en los datos de correlación de spearman (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 52
- Figura 14.** Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno (copias de gen *nifH* g^{-1} de suelo) en tratamientos contaminados con Cd y control. 52
- Figura 15.** Modelos de regresión de abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno (copias de genes *nifH* g^{-1} de suelo) versus concentraciones de Cd total (CdT), Cd soluble (CdW) y Cd biodisponible (CdE). 54
- Figura 16.** Carbono de biomasa microbiana de suelo contaminado con Cd en comparación con el control (suelo no contaminado). 55
- Figura 17.** Correlograma de Carbono microbiano vs propiedades químicas del suelo basado en los datos de correlación de spearman (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 55
- Figura 18.** Modelos de regresión de Carbono microbiano versus concentraciones de Cd total (CdT), Cd soluble (CdW) y Cd biodisponible (CdE). 56
- Figura 19.** Velocidad de transporte de electrones (ETR) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), hora 1:00 pm, de *Echinocactus platyacanthus* en suelo contaminado con Cd. 58
- Figura 20.** Modelos de regresión de ETR versus concentraciones de Cd total (CdT), Cd soluble (CdW) y Cd biodisponible (CdE). 59
- Figura 21.** Concentración de Cd en tejido foliar y raíz de *Echinocactus platyacanthus* en suelo contaminado con Cd al final del experimento. 60
- Figura 22.** Modelos de regresión de concentración de Cd foliar versus concentraciones de Cd total (CdT), Cd soluble (CdW) y Cd biodisponible (CdE). 61
- Figura 23.** Modelos de regresión de concentración de Cd en raíz versus concentraciones de Cd total (CdT), Cd soluble (CdW) y Cd biodisponible (CdE). 62
- Figura 24.** Curvas de rarefacción de los tratamientos no contaminados (1) y contaminados con Zn (2). Las curvas representan el promedio de las tres réplicas de cada tratamiento. Los OTUs fueron establecidos al 97% de identidad. 63

Figura 25. Índice de Shannon para tratamientos no contaminados (Periodo 1) y contaminados con Zn (Periodo 2).....	65
Figura 26. Modelos de regresión de índice de Shannon versus concentraciones de Zn total (ZnT), Zn soluble (ZnW) y Zn biodisponible (ZnE).	66
Figura 27. Heatmap de composición relativa bacteriana a nivel de Phyla de los tratamientos en estudio (>1% de presencia).....	67
Figura 28. Heatmap de composición relativa bacteriana a nivel de Genero de los tratamientos en estudio (porcentaje >2% de presencia).	68
Figura 29. Correlograma de bacterias a nivel de genero vs propiedades químicas del suelo basado en los datos de correlación de Spearman (*p<0.05, **p<0.01).....	69
Figura 30. Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno (copias de genes <i>nifH</i> g ⁻¹ de suelo) en tratamientos contaminados con Zn y control.	69
Figura 31. Modelos de regresión de abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno (copias de genes <i>nifH</i> g ⁻¹ de suelo) versus concentraciones de Zn total (ZnT), Zn soluble (ZnW) y Zn biodisponible (ZnE).	70
Figura 32. Carbono de biomasa microbiana de suelo contaminado con Zn en comparación con el control (suelo no contaminado).	71
Figura 33. Modelos de regresión de Carbono microbiano versus concentraciones de Zn total (ZnT), Zn soluble (ZnW) y Zn biodisponible (ZnE).	72
Figura 34. Modelos de regresión de ETR versus concentraciones de Zn total (ZnT), Zn soluble (ZnW) y Zn biodisponible (ZnE).....	74
Figura 35. Concentración de Zn en tejido de tallo de <i>Echinocactus platyacanthus</i> en suelo contaminado con Zn.....	75
Figura 36. Correlograma de Zn tallo y raíz vs propiedades químicas del suelo basado en los datos de correlación de Pearson (*p<0.05, **p<0.01).	75

Figura 37. Modelos de regresión de concentración de Zn foliar versus concentraciones de Zn total (ZnT), Zn soluble (ZnW) y Zn biodisponible (ZnE). 77

Figura 38. Modelos de regresión de concentración de Zn en raíz versus concentraciones de Zn total (ZnT), Zn soluble (ZnW) y Zn biodisponible (ZnE). 78

Lista de tablas

Tabla 1. Normas reguladoras de los metales pesados en suelo agrícola (mg kg^{-1})..... 14

Tabla 2. Técnicas y Metodologías analíticas para la caracterización del suelo no contaminado 30

Tabla 3. Concentraciones de referencia para Cd y Zn. 32

Tabla 4. Concentraciones de Cd y Zn a usar en el experimento. 33

Tabla 5. Técnicas y Metodologías analíticas para la caracterización del suelo contaminado. 33

Tabla 6. Resultados propiedades químicas del suelo. 43

Tabla 7. Concentraciones (mg kg^{-1}) de Cd y Zn en el suelo..... 44

Tabla 8. Media \pm *Desviación estándar* de propiedades químicas de tratamientos contaminados con Cd y Zn y control. La significancia $p < 0.05$ (ANOVA de 1 factor de Kruskal Wallis). 44

Tabla 9. Media \pm *Desviación estándar* de contenido total (T), soluble (W) y biodisponible (E) de Cd y Zn en tratamientos contaminados con Cd y Zn y control. Significancia $p < 0.05$ (ANOVA de 1 factor de Kruskal Wallis) 45

Tabla 10. Media \pm desviación estándar de OTUs observados e índices de riqueza de tratamientos no contaminados y contaminados con Cd (Periodo 1 y 2, respectivamente).	47
Tabla 11. Modelo de regresión lineal automático paso adelante ($p < 0.05$), para diversidad bacteriana de Shannon en tratamientos contaminados con Cd.	48
Tabla 12. Modelo de regresión lineal automático paso adelante ($p < 0.05$), para abundancia de gen <i>nifH</i> en tratamientos contaminados con Cd.	53
Tabla 13. Media \pm desviación estándar de Rendimiento (REND) y Velocidad de transporte de electrones (ETR) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de <i>Echinocactus platyacanthus</i> , en periodo 1 (0 días, suelo no contaminado), periodo 2 (15 días, suelo contaminado) y periodo 3 (30 días, suelo contaminado).....	57
Tabla 14. Modelo de regresión lineal automático paso adelante ($p < 0.05$), para absorción de Cd foliar y en raíz en tratamientos contaminados con Cd.	60
Tabla 15. Media \pm desviación estándar de OTUs observados e índices de riqueza de tratamientos no contaminados y contaminados con Zn (Periodo 1 y 2, respectivamente).	64
Tabla 16. Modelo de regresión lineal automático paso adelante ($p < 0.05$), para diversidad bacteriana de Shannon en tratamientos contaminados con Zn.	65
Tabla 17. Media \pm desviación estándar de Rendimiento (REND) y Velocidad de transporte de electrones (ETR) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de <i>Echinocactus platyacanthus</i> , en periodo 1 (0 días, suelo no contaminado), periodo 2 (15 días, suelo contaminado) y periodo 3 (30 días, suelo contaminado).....	73
Tabla 18. Modelo de regresión lineal automático paso adelante ($p < 0.05$), para absorción de Zn foliar y en raíz en tratamientos contaminados con Zn.	76

Bibliografía

Aguilar, J., Dorronsoro, C., Bellver, R., Fernández, E., Fernández, J., García, I., Iriarte, A., Martín, F., Ortíz, I., Simón, M. 2003. Contaminación de los suelos tras el vertido tóxico de Aznalcóllar. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Granada, España.

Alef, K. y Nannipieri, P (Eds). 1978. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp. 79-87.

Alvarez, A., Saez, J.M., Davila, J.S., Colin, V.L., Fuentes, M.S., Cuozzo, S.A., Benimeli, C.S., Polti, M.A. and Amoroso, M.J. 2017. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. Review. *Chemosphere* 166, 41-62.

Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S.M., Ok, Y.S., Sebastian, A., Baum, C., Prasad, M.N., Wenzel, W. and Rinklebe, J. 2017. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews*, 171, 621–645

Aragón, J.L., Flores, J., Yáñez, L., Badano, E., Ramírez, H.M., Rodas, J.P. y González, C. 2014. Induced climate change impairs photosynthetic performance in *Echinocactus platyacanthus*, an especially protected Mexican cactus species. *Flora*, 209, 499–503.

Aragón, J.L., Badano, E., Yáñez, L., Ramírez, H., Rodas, J.P., González, C. y Flores, J. 2017. Seedling survival of three endemic and threatened Mexican cacti under induced climate change. *Plant Species Biology*, 32, 92–99.

Ashraf, M., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M., Arif, M. 2017. Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: A review. *Journal of Environmental Management*, 198, 132-143.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.

Bakker, M.G., Schlatter, D.C., Otto-Hanson, L. and Kinkel, L.L. 2014. Diffuse symbioses: roles of plant–plant, plant–microbe and microbe–microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Molecular Ecology*, 23, 1571–1583.

Baz, S.E., Baz, M., Barakate, M., Hassani, L., Gharmali, A.E. and Imziln, B. 2015. Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *Scientific World Journal*, 2015, 14 pages.

BNA (Bureau of National Affairs, INC). 2008. Emerging Environmental Regimes for Contaminated Land in Latin America. *International Environment Reporter*, 31(21), 1-11.

Barahona, E. 1984. Determinaciones analíticas en suelos. Normalización de métodos. Determinación de carbonatos totales y caliza activa (Grupo de trabajo de Normalización de Métodos Analíticos). I Congreso de la Ciencia del Suelo, Madrid, España, 1, 53-67.

Benavides, M.P., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1), 21-34.

Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B. y Scheckel, K. 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize?. Review. *Journal of Hazardous Materials*, 266, 141– 166.

Bordez, L., Jourand, P., Ducouso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S., Claverie, J.M., Wantiez, L., Leveau, A. y Amir, H. 2016. Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Molecular Ecology*, 25, 2258–2272.

Bourceret, A., Cébron, A., Tisserant, E., Poupin, P., Bauda, P., Beguiristain, T. and Leyval, C. 2016. The Bacterial and Fungal Diversity of an Aged PAH- and Heavy Metal-Contaminated Soil is affected by Plant Cover and Edaphic Parameters. *Microb Ecol.* 71, 711–724.

Bouyoucos, G. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agron. J.*, 54, 464-465.

Bressan, M., Trinsoutrot G, I., Desaire, S., Castel, L., Gangneux, C., Laval, K. 2015. A rapid flow cytometry method to assess bacterial abundance in agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 88, 60–68.

Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 198-207.

Burges, A., Epelde, L., Garbisu, C. 2015. Impact of repeated single-metal and multi-metal pollution events on soil quality. *Chemosphere*, 120, 8–15.

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. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6, 1621-1624.

Ceballos, G., List, R., Garduño, G., Cano L, R., Muñozcano, M.J., Collado, E., San Román, J.E. 2009. La diversidad biológica del Estado de México estudio de estado. Toluca de Lerdo, Estado de México.

Chiboud, M., Saadani, O., Fatnassi, I., Abdelkrim, S., Abid, G., Jebara, M., Jebara, S. 2016. Characterization of efficient plant-growth-promoting bacteria isolated from *Sulla coronaria* resistant to cadmium and to other heavy metals. *C. R. Biologies*, 339, 391–398.

Chien, C., Kuo, Y., Chen, C., Hung, C., Yeh, C., Yeh, W. 2008. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 359–363.

Chodak, M., Golebiewski, M., Morawska-Ploskonka, J., Kuduk, K., Nikińska, M. 2013. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology*, 64, 7–14.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1993. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Una guía teoría y práctica de Metodologías. Documento de trabajo No 129. Disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/Digital/S593.M2_Manual_de_an%C3%A1lisis_de_suelos_y_tejido_vegetal_Una_gu%C3%ADa_te%C3%B3rica_y_pr%C3%A1ctica_de_metodologia.pdf

Cortés, L.E., Bravo, I., Martín, F.J., Menjivar, J.C. 2015. Adsorción de metales pesados en andisoles, vertisoles y ácidos húmicos. *Acta Agronómica*, 64 (1), 61-71.

Ehleringer, J. 1981. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran Desert plants. *Oecologia* 49, 366–370.

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F. and Xie, Y. 2015. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-18.

Epelde, L., Lanzén, A., Blanco, F., Urich, T. and Garbisu, C. 2015. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine. *FEMS Microbiology Ecology*, 91 (1), 1-11.

Epelde, L., Muñiz, O. and Garbisu, C. 2016. Microbial properties for the derivation of critical risk limits in cadmium contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 99, 19–28.

Etesami, E. 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 175–191.

Ford, T. 1994. Pollutant Effects on the Microbial Ecosystem. *Environmental Health Perspectives*, 102 (12), 45-48

Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.* 30 (10/11), 1389-1414,

Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 2031–2037.

Gołębiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., Tretyn, A., Wróbel, B. 2014. 16S rADN Pyrosequencing Analysis of Bacterial Community in Heavy Metals Polluted Soils. *Microb. Ecol.*, 67, 635–647.

Guarino, C. y Sciarrillo, R. 2017. Effectiveness of in situ application of an Integrated Phytoremediation System (IPS) by adding a selected blend of rhizosphere microbes to heavily multi-contaminated soils. *Ecological Engineering*, 99, 70–82.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64, 7-15.

He, Z., Shentu, J., Yang, X., Baligar, V.C., Zhang, T. & Stoffella, P.J. 2015. Heavy Metal Contamination of Soils: Sources, Indicators, and Assessment. *Journal of Environmental Indicators*, 9, 17-18.

Hema, T.G., Getha, K., Tan, G., Sahira, H.L., Syamil, A.M. and Fairuz, M.Y. 2014. Actinobacteria isolates from tin tailings and forest soil for bioremediation of heavy metals. *Journal of Tropical Forest Science* 26(1), 153–162.

Hu, Q., Qi, H., Zeng, J. and Zhang, H. 2007. Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 74–79.

Huang, Q., Huang, P.M., and Violante, A. 2008. *Soil Mineral– Microbe–Organic Interactions. Theories and Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Huang, Y., Li, T., Wu, C., He, Z., Japenga, J., Deng, M. and Yang, X. 2015. An integrated approach to assess heavy metal source apportionment in peri-urban agricultural soils. *Journal of Hazardous Materials*, 299, 540–549.

ICONTEC. 2003. Norma Técnica Colombiana NTC 3934 para la Determinación de Metales en Extractos de Suelos. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Bogotá, Colombia. 26 pp.

IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi). 2006. Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Imprenta Nacional de Colombia, Sexta Edición. Bogotá. ISBN: 9789589067987.

Illumina technology. SF. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System.

Islam, E. y Sar, P. 2011. Molecular assessment on impact of uranium ore contamination in soil bacterial diversity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 1043-1051.

ISO 14240-2:1997. Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.

Joergensen, R.G. 1996. The fumigation – extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the K_{EC} value. *Soil Biology & Biochemistry*, 28, 25-31.

Kabata-Pendias, A. 2011. Trace Elements in Soils and Plants. (4^a Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. United States.

Khan, S., Hesham, A., Qiao, M., Rehman, S., He, J.Z. 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 17, 288–296.

KJeldahl, J. 1883. Heuo molhodo zur besllmmung des slckstoffs en organlschan korpern. *Z. Anal. Cham.* 22, 366-382.

Kothe, E. y Varma, A. 2012. *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.

Lau, J.A. y Lennon, J.T. 2011. Evolutionary ecology of plant–microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. *New Phytologist*, 192, 215–224.

Levresse, G., Lopez, G., Tritlla, J., Cardellach, E., Carrillo, A., Mascuñano, E., Soler, A., Corbella, M., Hernández, L.G. and Corona, R. 2012. Phytoavailability of antimony and heavy metals in arid regions: The case of the Wadley Sb district (San Luis, Potosí, Mexico). *Science of the Total Environment* 427–428, 115–125.

Li, X., Huang, L., Bond, P., Lu, Y., Vink, Y. 2014. Bacterial diversity in response to direct revegetation in the Pb–Zn–Cutailings under subtropical and semi-arid conditions. *Ecological Engineering*, 68, 233–240

Liao, M., Luo, Y.K., Zhao, X.M. and Huang, C.Y. 2005. Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in a paddy soil. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B (5), 324-330.

Lin, X., Mou, R., Cao, Z., Xu, P., Wu, X., Zhu, Z., Chen, M. 2016. Characterization of cadmium-resistant bacteria and their potential for reducing accumulation of cadmium in rice grains. *Science of the Total Environment*, 569–570, 97–104.

Lindsay, W.L., Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421-428.

López, N.E., Carcaño, M.G., Bashan, Y. 2016. Using native trees and cacti to improve soil potential nitrogen fixation during long-term restoration of arid lands. *Plant Soil*, 403, 317–329

Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., Freitas, H. 2016. Inoculation of *Brassica oxyrrhina* with plant growth promoting bacteria for the improvement of heavy metal phytoremediation under drought conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 320, 36–44.

Maheshwari, D.K. 2014. *Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture*. Springer International Publishing Switzerland.

Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A. y Coto-Pérez, O. 2010. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41 (1), 67-78.

Marrugo-Negrete, J., Pinedo-Hernández, J., Díez, S. 2017. Assessment of heavy metal pollution, spatial distribution and origin in agricultural soils along the Sinú River Basin, Colombia. *Environmental Research*, 154, 380–388.

Meuser, H. 2013. *Soil Remediation and Rehabilitation. Treatment of Contaminated and Disturbed Land*. Springer Science+Business Media Dordrecht.

Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.

Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A. 2001. Nitric oxide. *Biology and chemistry*, 5, 62.

Mirsal, I.A. 2008. *Soil Pollution. Origin, Monitoring & Remediation*. 2^a edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Mirza, B., Potisap, C., Nüsslein, K., Bohannan, B. and Rodrigues, J. 2014. Response of Free-Living Nitrogen-Fixing Microorganisms to Land Use Change in the Amazon Rainforest. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 281–288.

Moffet, B., Nicholson, F., Uwakwe, N., Chambers, B., Harris, J. and Hill, T. 2003. Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 13-19.

Moreira, F., Lange, A., Klauberg-Filho, O., Siqueira, J., Nóbrega, R. and Lima, A. 2008. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 80(4), 749-761.

Moreira, H., Pereira, S., Marques, A., Rangel, A., Castro, P. 2016. Selection of metal resistant plant growth promoting rhizobacteria for the growth and metal accumulation of energy maize in a mine soil—Effect of the inoculum size. *Geoderma*, 278, 1–11.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, T., Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G. 2017. Microbial diversity and soil functions. *Landmark Papers. European Journal of Soil Science*, 68, 1-26.

Narendrula-Kotha, R. y Nkongolo, K. 2017. Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. *Ecological Genetics and Genomics*, 2, 13-24.

Navarrete, A.A., Mellis, E.V., Escalas, A., Lemos, L.N., Junior, J.V., Quaggio, J.A., Zhou, J., Tsai, S.M. 2017. Zinc concentration affects the functional groups of microbial

communities in sugarcane-cultivated soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 236, 187–197.

Ofek, M., Hadar, Y. and Minz, D. 2012. Ecology of Root Colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). *PLoS ONE*, 7(7), 40117.

Orgiazzi, A., Dunbar, M.B., Panagos, P., De Groot, G.A., Lemanceau, P. 2015. Soil biodiversity and ADN barcodes: opportunities and challenges. *Soil Biology & Biochemistry*, 80, 244-250.

Park, J.H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N. y Chung, J.W. 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. Review. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 549–574.

Poly, F., Monrozier, L.J., Bally, R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol*, 152, 95–103

Probert, M.E. 1976. Studies of "available" and isotopically exchangeable sulphur In some N. Queensland soils. *Plant and Soil*, 45, 461-475.

Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. 2009. Guadalcázar, San Luis Potosí. Clave geoestadística 24017

Quevauviller, P., Lachica, M., Barahona, E., Gómez, A., Rauret, G., Ure, A., Muntau, H. 1998. Certified reference material for the quality control of EDTA and DTPA extractable trace metal contents in calcareous soils (CRM 6000). *Presenius J. Anal. Chem.*, 360, 505–511.

Radhakrishnan, R., Hashem, A. and Abd Allah, EF. 2017. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Front Physiol.*, 8, 667.

Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V. and Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142-149.

Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V. and Freitas, H. 2012. Perspectives of plant associated microbes in heavy metal phytoremediation. Review. *Biotechnology Advances*, 30, 1562–1574

Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. B.O.E. No 15, 18 de enero de 2005. España.

Redmile-Gordon, M. and Chen, Li. 2017. Zinc toxicity stimulates microbial production of extracellular polymers in a copiotrophic acid soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 119, 413-418.

Reeuwijk, LP. 2002. *Procedures for Soil Analysis*. Editor (6th edition). Technical Paper/International Soil Reference and Information Centre, Wageningen, The Netherlands.

Renella, G., Brookes, P.C. and Nannipieri, P. 2002. Cadmium and zinc toxicity to soil microbial biomass and activity. *Developments in Soil Science* 28B, 267-273.

Rhoades, J.D. 1982. Cation exchange capacity. In: *Methods of Soil Analysis* (AL Page et al, eds). *Agronomy (Madison)* 9, 149-157.

Ritchie, R.J., Bunthawin, S. 2010. The use of pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry to measure photosynthesis in a CAM orchid, *Dendrobium* spp. (*D. cv. Viravuth Pink*). *Int. J. Plant Sci.* 171, 575–585.

Roane, T.M y Pepper, I.L. 2000. Microbial Responses to Environmentally Toxic Cadmium. *Microbial Ecology*, 38, 358–364.

Roberts, A., Griffiths, H., Borland, A.M., Reinert, F. 1996. Is crassulacean acid metabolism activity in sympatric species of hemi-epiphytic stranglers such as *Clusia* related to carbon cycling as a photoprotective process?. *Oecologia*, 106, 28–38.

Rueda, G., Rodríguez, J., Madriñán, R. 2011. Metodologías para establecer valores de referencia de metales pesados en suelos agrícolas: Perspectivas para Colombia. *Acta agronómica*, 60 (3), 203-218.

Santos, D., Duarte, B. and Caçador, I. Unveiling Zn hyperaccumulation in *Juncus acutus*: Implications on the electronic energy fluxes and on oxidative stress with emphasis on non-functional Zn-chlorophylls. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 228–239.

Sarria, M.M. 2013. Evaluación del comportamiento de arsénico, cobre, plomo y zinc en suelos afectados por el vertido de la mina de Aznalcóllar (Sevilla, España). Tesis maestría. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Sathya, A., Vijayabharathi, R. and Gopalakrishnan, S. 2017. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*. 7(2), 102.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2007. Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario Oficial (Segunda sección).

Shentu, J.L., He, Z.L., Zeng, Y.Y., He, S.Y., Du, S.T. and Shen, D.S. 2014. Microbial Biomass and PLFA Profile Changes in Rhizosphere of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) as Affected by External Cadmium Loading. *Pedosphere* 24(4), 553–562.

Sherameti, I. y Varma, A. 2010. *Soil Biology: Soil Heavy Metals*. Volume 19. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Sherameti, I. y Varma, A. 2011. *Detoxification of Heavy Metals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Simonet, P., Grosjean, M.C., Misra, A.K., Nazaret, S., Cournoyer, B., Normand, P. 1991 Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3278–3286.

Six, L. y Smolders, E. 2014. Future trends in soil cadmium concentration under current cadmium fluxes to European agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 485–486, 319–328.

Smets, W., Leff, J.W., Bradford, M.A., McCulley, R.L., Lebeer, S., Fierer, N. 2016. A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing. *Soil Biology & Biochemistry*, 96, 145-151

Sposito, G., Lund, L.J. y Chang, A.C. 1982. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge. I: Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 260-264.

Sobariu, D., Tudorache, D., Diaconu, M., Vasile L., Hlihor, R., Dragoi, E., Curteanu, S., Lenz, M., Corvini, P., Gavrilescu, M. 2016. Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New Biotechnology*, 39(Pt A):125-134.

Suresh, K., Dahms, H., Lee, J., Chul, H., Lee, W. and Shin, K. 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Review. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 51-71.

Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu R. 2012. Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 99, 10-17.

Tipayno, S., Kim, C-G., Sa, T. 2012. T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation. *Applied Soil Ecology*, 61, 137–146.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R-A., Øvreås, L. 1998. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64, 53–62.

Torsvik, V., Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240–245.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., y Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 327–338.

Ullah, A., Mushtaq, H., Ali, H., Munis, H., Javed, M. and Chaudhary, H. 2015. Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. Review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 2505-2514.

USDA. United States Department of Agriculture. 1999. Soil Quality Test Kit Guide. Washington, D.C., United States.

Valls, M. y De Lorenzo, V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 327-338.

Vigliotta, G., Matrella, S., Cicatelli, A., Guarino, F., Castiglione, S. 2016. Effects of heavy metals and chelants on phytoremediation capacity and on rhizobacterial communities of maize. *Journal of Environmental Management*, 179, 93-102.

Vimal, S.R., Singh, J.S., Arora, N.K., Singh, S. 2017. Soil-Plant-Microbe Interactions in Stressed Agriculture Management: A Review. *Pedosphere*, 27(2), 177–192.

Wang, Y., Shi, J., Wang, H., Lin, Q., Chen, X., Chen, Y. 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, p. 75-81.

Wang, Q., Xie, N., Huang, Y., Song, L., Du, Q., Yu, B., Chen, D. and Huang, R. 2014. Genome Sequence of *Tumebacillus flagellatus* GST4, the First Genome Sequence of a Species in the Genus *Tumebacillus*. *Genome Announcements*, 2 (6), 01189-14.

Wang, Q., Xie, Z., Li, F. 2015. Using ensemble models to identify and apportion heavy metal pollution sources in agricultural soils on a local scale. *Environmental Pollution*, 206, 227-235.

Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A. 2007. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium sp. (vigna)* on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere*, 70, 36–45

Wartiainen, I., Eriksson, T., Zheng, W. and Rasmussen, U. 2008. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied soil ecology*, 39, 65–75.

Xie, Y., Fan, J., Zhu, W., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L., Fu, J. 2016. Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. *Frontiers in Plant Science*, 7, 755.

Xu, J., y Sparks, D. 2013. *Molecular Environmental Soil Science*. EBook. Springer Dordrecht Heidelberg, New York London.

Zhang, H.B., Yang, M.X., Shi, W., Zheng, Y., Sha, T. and Zhao Z.W. 2007. Bacterial Diversity in Mine Tailings Compared by Cultivation and Cultivation-independent Methods and their Resistance to Lead and Cadmium. *Microbial Ecology*, 54, 705–712

Zhang, J., Wang, L.H., Yang, J-C., Liu, J. and Dai J-L. 2015. Health risk to residents and stimulation to inherent bacteria of various heavy metals in soil. *Science of the Total Environment*, 508, 29–36.

Zhang, C., Nie, S., Liang, J., Zeng, G., Wu, H., Hua, S., Liu, J., Yuan, Y., Xiao, H., Deng, L. y Xiang, H. 2016. Effects of heavy metals and soil physicochemical properties on wetland soil microbial biomass and bacterial community structure. *Science of the Total Environment*, 557–558, 785–790.