



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magister en Ciencias

**Efectos de la exposición a nanopartículas de cobre y
plaguicidas sobre la actividad metabólica de *Nitrobacter
winogradskyi***



Tesis para optar al grado de
Magister en Ciencias mención Microbiología

ROBERTO IGNACIO GAJARDO ALISTER

CONCEPCIÓN-CHILE

2021

Profesor Guía: MIGUEL MARTINEZ POBLETE

Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía:

Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Gonzalo Tortella Fuentes
Centro de Excelencia en
Investigación Biotecnológica Aplicada
al Medio Ambiente (CIBAMA)
Universidad de La Frontera

Director de Programa:

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Se hace difícil comenzar a enumerar a todas personas que he conocido y con quienes estoy en agradecimiento, desde ya pido disculpas a quienes dejo afuera por la brevedad.

Agradecer a mis padres, Ximena e Ignacio, por todos estos años de esfuerzo y especialmente a “*Mami Tola*” María A. Roa Carrera por este año especial, que, si bien ha traído preocupaciones, también nos trajo alegría y esperanza. Un especial agradecimiento a mi hermana Ximena y mi sobrina Emilia, que han sido mis soles especiales durante los meses más sombríos de la pandemia, siempre con ganas de salir adelante y con alegría.

Agradezco también a María José por tu inmenso amor y apoyo incondicional durante todo este tiempo, por la paciencia durante los años de experimentos hasta tarde, por los “chuta, anda tú nomas”, o los “oye, me quedan 40 minutos” que se convirtieron en 2 horas. El tiempo quedó pequeño entre nosotros y espero que nuestro futuro próximo sea mejor aún.

Agradezco al Dr. Miguel Martínez por su imparable labor docente, su perspicacia y sagacidad con sugerencias e interpretaciones, gracias también por las conversaciones sobre una tremenda diversidad de tópicos y por siempre demostrar que el tiempo vale oro cuando se toma de forma relajada.

Agradecer también al Dr. Gonzalo Tortella por sus gestiones para el análisis MALDI TOF/TOF MS, y también agradecer al personal de su laboratorio. También agradezco a la comisión evaluadora conformada por Dr. Víctor Campos Araneda y Dr. Carlos González, por siempre tener buena voluntad para ofrecer sugerencias certeras u opiniones técnicas. Un especial agradecimiento al Dr. Boris Parra por su apoyo experimental y por las discusiones respecto a las nanopartículas de cobre.

Aún recuerdo cuando llegué a pedir un tema para investigación y me acerqué al laboratorio del profe Miguel, sin pensar que encontraría una segunda casa (¡literalmente!). En ese entonces tenía una imagen de la ciencia que significaba algo serio o pomposo (¿y acaso no lo es a veces? ¿Eh?), pero me encontré con colegas y amigos que, estaban dispuestos a ayudarte, a responder a preguntas o a darte una opinión sincera, que me mostraron la otra cara de la ciencia, la parte más humana y colaborativa, que ahora considero fundamental.

A veces entre experimento y experimento se pasaban horas de trabajo y vimos literalmente “correr el sol” dentro del laboratorio. Quisiera agradecer a todos quienes conformaron o son parte del equipo del Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación, en especial a Ruth, Boris, Cristian, Karina, Jonathan, Melissa, Paulina, Matías, Carla y Beatriz. Espero pronto nos reunamos para compartir, comer pizzas o tomar un café.

Un gran abrazo a todos.

Finalmente agradecer también a la familia Roa, y decir que tienen todo mi apoyo en este año difícil, esto también va dedicado para ustedes y para quienes tuvieron complicaciones de salud.

Esta tesis fue apoyada por el Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación, Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción, Chile. Agradecimientos a FONDECYT proyecto N° 1161713, que otorgó los recursos necesarios para su ejecución.



*“God’s in his heaven,
All’s right with the world”*

R. Browning

CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	11
HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS.....	43
METODOLOGÍA	44
RESULTADOS.....	51
DISCUSIÓN.....	72
CONCLUSIÓN	80
PROYECCIONES.....	81
REFERENCIAS	82
ANEXO I: TABLAS RESUMEN TRATAMIENTOS.....	111
ANEXO II: DETALLES RESULTADOS MALDI TOF/TOF MS	117
ANEXO III: ANALISIS UNIPROT	126
ANEXO IV: SCRIPTS EMPLEADOS.....	134



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadena transportadora de electrones de <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	16
Figura 2. Estructura química de Iprodiona, Carbendazim y 2,4-D.	36
Figura 3. Estructura química de catecol, 3,5-dicloroanilina y 2,4-diclorofenol.....	38
Figura 4. Esquema de reacciones de biodegradación de Iprodiona a 3,5-dicloroanilina.	39
Figura 5. Esquema de reacciones de biodegradación de carbendazim a catecol.	40
Figura 6. Esquema de reacciones de biodegradación de 2,4-D a 2,4-dichlorophenol.	41
Figura 7. Esquema de diseño experimental de tratamientos.....	47
Figura 8. Cambios en la actividad metabólica de <i>N. winogradskyi</i> a 8 días de exposición en tratamientos con CuNPs, CuONPs y CuSO ₄	52
Figura 9. Cambios en la actividad metabólica de <i>N. winogradskyi</i> a 8 días generados por la exposición a tratamientos con los fungicidas iprodiona, carbendazim y el herbicida 2,4-D.....	53
Figura 10. Cambios en la actividad metabólica de <i>N. winogradskyi</i> a 8 días generados por la exposición a tratamientos combinados con el fungicida carbendazim y especies cúpricas (CuNPs, CuONPs, CuSO ₄).....	54
Figura 11. Cambios en la actividad metabólica de <i>N. winogradskyi</i> a 8 días generados por la exposición a tratamientos combinados con el fungicida iprodiona y especies cúpricas (CuNPs, CuONPs, CuSO ₄).....	55
Figura 12. Cambios en la actividad metabólica de <i>N. winogradskyi</i> a 8 días generados por la exposición a tratamientos con los derivados biodegradativos, 3,5-dicloroanilina, catecol y 2,4-diclorofenol.	56
Figura 13. Cambios en la actividad metabólica de <i>N. winogradskyi</i> a 8 días generados por la exposición a tratamientos combinados entre los derivados biodegradativos (3,5-dicloroanilina, catecol, 2,4-diclorofenol) y CuNPs	57
Figura 14. Isobologramas del modelo de Aditividad de Loewe.....	62
Figura 15. Isobologramas del modelo Highest Single Agent (HSA).....	64
Figura 16. Tablas de Aditividad, modelo de Loewe, para series Carbendazim e Iprodiona	65
Figura 17. Tablas de Aditividad, modelo de Loewe, para series CuNPs y compuestos derivados.....	66
Figura 18. Cambios en el perfil de proteínas de <i>N. winogradskyi</i> generados por exposición a tratamientos, obtenido por MALDI-TOF/TOF MS.	67
Figura 19. Comparación de principales peaks de intensidad de señal en perfiles proteicos obtenidos por MALDI-TOF/TOF MS para distintos tratamientos.	68
Figura 20. PCoA generado a partir de PERMANOVA para peaks mayores a 500 m/z desde análisis MALDI-TOF MS/MS..	69
Figura 21. Heatmap generado a partir de proteínas predichas desde la base de datos UNIPROT, para peaks mayores a 500 m/z, obtenidos desde análisis MALDI-TOF MS/MS.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales organismos nitrificantes (bacterias amonio-oxidantes AOB, nitrito-oxidantes NOB y arqueas amonio-oxidantes AOA).....	15
Tabla 2. Factores y mecanismos que afectan el destino y comportamiento de nanopartículas metálicas	27
Tabla 3. Listado de librerías en R utilizadas para los análisis estadísticos y modelos en la presente tesis.	48
Tabla 4. Estimación de IC ₅₀ (inhibición de la actividad metabólica) de compuestos químicos ensayados sobre <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	58
Tabla 5.1-3. Resultados de Análisis SRH para ensayos de combinaciones con carbendazim, CuNPs, CuONPs y CuSO ₄	59
Tabla 6.1-3. Resultados de Análisis SRH para ensayos de combinaciones con iprodione, CuNPs, CuONPs y CuSO ₄	60
Tabla 7.1-4. Resultados Análisis SRH para ensayos de combinaciones entre CuNPs, junto a 2,4-D, 2,4-diclorofenol, 3,5-dicloroanilina y catecol.	61
Tabla 8. Prueba t para comparación entre principales peaks de intensidad de señal generados en perfiles proteicos obtenidos por MALDI-TOF/TOF MS.	68
Tabla 9. Resultados del test de PERMANOVA y Comparación por pares entre tratamientos.....	70
Tabla 10. Lista de Proteínas detectadas en base de datos UNIPROT.....	72



ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2,4DCF: 2,4-diclorofenol

3,5-DCA: 3,5-dicloroanilina

AOA: arqueas oxidantes del amonio

AOB: bacterias oxidantes del amonio

CAR: Carbendazim

CuNPs: nanopartículas de cobre

CuONPs: nanopartículas de óxido de cobre

HSA: modelo *Highest Score Agent*

IHN: inhibidores de nitrificación

IPR: Iprodiona

NOB: bacterias oxidantes del nitrito

NXR: nitrito-oxidorreductasa

PERMANOVA: Análisis Multivariado de Varianza no-paramétrico

ROS: especies reactivas de oxígeno

SRH: test *Scheirer-Ray-Hare*



RESUMEN

Las nanopartículas de cobre (CuNPs) pueden ser aplicadas individualmente o en combinación con plaguicidas en cultivos agrícolas. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de CuNPs puede generar alteraciones en el proceso de nitrificación en el suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos sobre la actividad metabólica del organismo nitrificante *Nitrobacter winogradskyi* por la exposición simultánea de CuNPs y CuONPs junto a plaguicidas (iprodiona, carbendazim, 2,4-D), y derivados de plaguicidas (3,5-dicloroanilina, catecol y 2,4-diclorofenol) en concentraciones crecientes.

Los resultados mostraron que CuNPs posee mayor inhibición de la actividad metabólica de *N. winogradskyi* que CuONPs, con un nivel de toxicidad similar a CuSO_4 , mientras que los derivados de plaguicidas fueron más tóxicos que los plaguicidas. Los tratamientos combinados con CuNPs y plaguicidas o derivados de plaguicidas fueron tan tóxicos como los tratamientos con CuNPs por sí solos. El análisis MALDI TOF/TOF MS sugirió que hay diferencias en el perfil de proteínas entre tratamientos, mientras que carbendazim fue el compuesto que generó más cambios en el perfil de proteínas. Los modelos de aditividad de Loewe, HSA y el análisis SRH sugirieron que la mayoría de los efectos de las mezclas fueron aditivas, atribuidos tanto a CuNPs como a CuONPs.

Los resultados sugieren que CuNPs y CuONPs generaron disminución de la actividad metabólica de *N. winogradskyi*, generando efectos negativos aditivos junto a plaguicidas y derivados. Las CuNPs pueden representar un riesgo para el ciclo del nitrógeno y la salud de los suelos agrícolas. Esta tesis provee de información sobre los riesgos de usar CuNPs y sus peligros para los microorganismos nitrificantes del suelo.

ABSTRACT

Copper nanoparticles (CuNPs) can be applied alone or in combination with pesticides on agricultural crops. Nonetheless, the presence of CuNPs on soil are considered harmful, and associated with altered nitrification rates. The objective of this work was to evaluate the effects on metabolic activity of *Nitrobacter winogradskyi* of simultaneous exposure of CuNPs and CuONPs in mixture with pesticides (iprodione, carbendazim, 2,4-D), and pesticides derivatives (3,5-dichloroaniline, catechol, 2,4-dichlorophenol).

Results shown that CuNPs is more inhibitory on the metabolic activity of *N. winogradskyi* than CuONPs, reaching similar levels in comparison to CuSO_4 , meanwhile pesticide derivatives were more toxic than pesticides. Combined treatment with CuNPs and pesticides or pesticides were as inhibitory as CuNPs alone. MALDI TOF/TOF MS analysis results suggested that there are differences on proteins profiles between treatments, and carbendazim generated most of the changes on the protein profile. Loewe Additivity, HSA model, and SRH analysis suggested that the majority of effects were additive, mainly attributed to CuNPs and CuONPs.

Results suggest that CuNPs and CuONPs negatively affected the metabolic activity of *N. winogradskyi*, generating negative and additive effects in mixture with pesticides and its derivatives. This work provides information about how CuNPs can represent a risk on nitrogen cycle and microorganisms commonly founded on agricultural soils.



INTRODUCCIÓN

1.1 Proyecciones en la demanda mundial de alimentos.

Se proyecta que para el año 2050, uno de los desafíos más grandes que enfrentará la humanidad será mantener la seguridad alimentaria mundial, implicando un reto sin precedentes por cambiar las prácticas agrícolas. Para esto, será fundamental el equilibrio de esfuerzo entre las prácticas sustentables en agricultura con enfoque ecosistémico, las estrategias de adaptabilidad al cambio climático y el desarrollo humano (Mekonnen, 2019).

Proyecciones sugieren que debe incrementarse la producción mundial de alimentos entre un 100% a un 70% para satisfacer la demanda de una población mundial proyectada en 9 mil millones de personas (Godfray *et al.*, 2010), sin embargo, se ha sugerido que con el ritmo de producción actual, la producción sería insuficiente para satisfacer los requerimientos de esos años (Ray *et al.*, 2013), existiendo zonas del planeta que estarán en riesgo de seguridad alimentaria, especialmente en África subsahariana (Onyutha, 2018).

También, se ha señalado que serán necesarios 100 millones de hectáreas de cultivos agrícolas y zonas de ganadería adicionales para incrementar al doble la producción de alimentos (Pastor *et al.*, 2019), y se ha sugerido que una disminución de la ingesta de carne de vacuno reducirá el consumo de piensos y suplementos alimenticios en ganadería, aumentando la eficiencia agrícola, que contribuirá a una disminución favorable de la generación de gases de efecto invernadero (Theurl *et al.*, 2020).

Por otra parte, el incremento de cultivos para fines bioenergéticos puede aumentar de forma considerable para mitad del presente siglo, generando presión por tener cultivos eficientes, aumentando la competencia por utilización de superficies agrícolas usadas para alimentación. Otras proyecciones señalan que solo un 75% de la superficie agrícola mundial actual sería realmente necesaria para satisfacer la demanda total de alimentos, mientras que el 25% restante podría representar la superficie utilizada para generar biocombustibles (Smeets *et al.*, 2007).

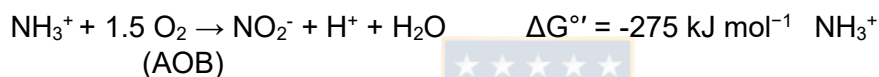
También se ha proyectado que se incrementará exponencialmente la automatización de cultivos y el uso de herramientas de biología molecular, y especialmente de modificación genética, surgirán plaguicidas mucho más eficientes, se incrementará el uso eficiente de recursos hídricos y el control crítico de superficies agrícolas (Hunter *et al.*, 2017), y en los sistemas de producción de ganado, se buscará mejorar la relación entre el manejo de abonos o purines y la intensificación, para asegurar la efectividad agrícola (Bouwman *et al.*, 2013).

Actualmente, se han propuesto nuevas alternativas de desarrollo al modelo de agricultura intensiva, incorporando prácticas más amigables con el medio ambiente y más adaptables (Poux & Aubert, 2018), ya que se ha recomendado que la producción agrícola debe aumentar la calidad de los alimentos, disminuyendo el uso de agroquímicos, minimizando los riesgos ambientales y de salud humana (Carvalho, 2017).

Sin embargo, la agricultura intensiva está aún lejos de alcanzar estos objetivos, actualmente se incorporan 120 millones de toneladas de N reactivo por año en el ciclo del nitrógeno, siendo el doble del nitrógeno integrado naturalmente por todo el resto de la biósfera (63 millones de toneladas) (Fowler *et al.*, 2013). Además, los suelos agrícolas están expuestos a pérdida de nitrógeno por volatilización (a la forma de NH₃), desnitrificación, emisiones de óxido nitroso y óxido nítrico (NO_x), y pérdida de nitratos (Bouwman *et al.*, 2005), así, se estima que entre el 50 y 70% de los fertilizantes nitrogenados usados es desaprovechado en agricultura y es usado por otros organismos (Coskun *et al.*, 2017).

1.2 Ciclo del Nitrógeno y Nitrificación.

En el ciclo del nitrógeno, la nitrificación es uno de los procesos considerados más importantes desde un punto de vista antropocéntrico, debido a sus implicancias para la agricultura, procesamiento de aguas hervidas y eutroficación, entre otros. Desde el punto de vista de procesos biogeoquímicos, es también uno de los puntos más importantes debido a la lentitud del proceso. La nitrificación constituye el proceso de generación de nitratos (NO₃⁻) a partir de amonio (NH₄⁺) mediante la oxidación de amonio a nitrito (NO₂⁻) y su consiguiente oxidación a nitrato; estos procesos están mediados usualmente por dos tipos de microorganismos clasificados tradicionalmente como oxidantes del amonio (AOB - *ammonia oxidizing bacteria*) y oxidantes de nitrito (NOB *nitrite oxidizing bacteria*).



Ecuaciones simplificadas de nitrificación y rendimiento termodinámico respectivos. Adaptado desde Daims *et al.*, 2016, Prosser, 1990.

Ambos procesos de oxidación, mediados por bacterias ocurren en condiciones aeróbicas y con metabolismo quimiolitotrófico, utilizando CO₂ como fuente de carbono. Sin embargo, existen otros organismos vinculados a este proceso, conocidos como oxidantes anaerobios del amonio (Anammox - *anaerobic ammonium oxidation*) (Kuenen, 2008) y Comammox (*complete ammonia oxidizer*) (Van Kessel *et al.*, 2015). Por otra parte, los organismos nitrificantes también pueden participar del proceso de desnitrificación bajo ciertas circunstancias (Devol, 2015). Los procesos de nitrificación y desnitrificación son procesos no-excluyentes, se ha detectado emisiones de óxido nitroso y óxido nítrico asociados a organismos clasificados como nitrificantes autótrofos (Mellbye *et al.*, 2018). Por otra parte, la nitrificación puede ser clasificada como heterotrófica (Zhang *et al.*, 2015), mixotrófica (Kouki *et al.*, 2011) o autotrófica (Prosser, 1990).

Pese a la versatilidad metabólica del proceso de nitrificación, se ha observado que estos procesos son susceptibles a ser alterados o inhibidos por agentes químicos, y esto puede ser explorado mediante curvas de saturación de amonio, nitritos y nitratos en suelo, reflejándose en un retraso del surgimiento de estas moléculas en comparación con situaciones consideradas normales (Hynes & Knowles, 1978; Gerards *et al.*, 1998).

Así, la ralentización de la nitrificación puede significar cambios en la dinámica de nitrógeno reflejados en comunidades y poblaciones bacterianas nitrificantes como también la inactivación momentánea del metabolismo para posteriormente iniciar el proceso (Geets *et al.*, 2006).

Por lo tanto, un retraso de la nitrificación podría significar un cambio en la dinámica de mineralización de nitratos (que puede beneficiar a ciertos cultivos), o una acumulación excesiva de nitritos en el suelo (Cleemput & Samater, 1995), sin embargo, desde una perspectiva opuesta, la estimulación de la nitrificación en plantas de tratamientos de aguas servidas o industriales es crucial ya que las aguas de descargas pueden contener grandes cantidades de amonio, representando una fuente de emisiones de amoniaco y óxido nitroso (Okabe *et al.*, 2011). Las ventajas de la mantención de una dinámica natural de nitrificación se pueden observar mayoritariamente en la acuicultura, especialmente para la disminución de los nitritos en el agua (Ciji & Akhtar, 2020), también, se ha demostrado que algunos microorganismos nitrificantes disminuyen efectivamente cantidades no deseadas de amonio, nitrito y nitratos en agua potable (Souza & de Aguiar, 2020), y aguas servidas (Ge *et al.*, 2015), siendo beneficiosos para el control de descarga de compuestos nitrogenados.

1.3 Organismos nitrificantes.

Se ha mencionado anteriormente que la nitrificación es un proceso que involucra una gran red extendida de microorganismos con una compleja diversidad metabólica, involucrando el uso de múltiples mecanismos para conversión de las especies químicas del nitrógeno. Los organismos nitrificantes se clasifican generalmente, en bacterias autótrofas oxidantes del amonio (AOB), arqueas oxidantes del amonio (AOA), bacterias oxidantes del nitrito (NOB) y nitrificantes heterótrofos. Las AOB pueden encontrarse en tanto en suelo (*Nitrosospira*, *Nitrosomonas*), en océanos y ambientes marinos (*Nitrosococcus oceani*), cuerpos de aguas continentales (*Nitrosomonas* y *Nitrosospira*) (Soliman & Eldyasti, 2018). Desde el punto de vista experimental, *Nitrosomonas* es el género más importante de las AOB debido a que algunas de sus especies (*N. europaea* y *N. eutropha*) pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio y pueden ser usadas para ensayos de toxicidad. Las bacterias amonio-oxidantes (AOB) son sensibles a la acidez, ya que el sustrato NH_3 está disponible solo a pH alto ($\text{pK}_a=9.26$, $\text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{NH}_4^+$) (Kowalchuk & Stephen, 2001).

Por otra parte, las NOB cohabitan con las AOB y generan el segundo paso de la nitrificación, sin embargo, están aún poco estudiadas en el contexto de ciclo del nitrógeno, ya que este proceso podría estar siendo llevado a cabo por bacterias no-cultivables. Sin embargo, en los últimos 20 años, con el surgimiento de herramientas metagenómicas y de ecología microbiana ha comenzado una revalorización de este grupo de organismos para abordar la dinámica de la generación de nitratos en suelo. Así, las bacterias nitrito-oxidantes comprenden principalmente los géneros *Nitrotoga*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira*, *Nitrobacter* y *Nitrolanceetus* que están distribuidos entre los phyla α -proteobacteria, β -proteobacteria, γ -proteobacteria, δ -proteobacteria, Nitrospirae y Chloroflexi (Sorokin *et al.*, 2012).

Finalmente las arqueas oxidantes del amonio, tienen una mayor afinidad por el amonio que las AOB, por lo que pueden ser inhibidas con mayor facilidad a altas concentraciones de amonio (Mussmann *et al.*, 2011). Sin embargo, esta mayor afinidad se ajusta a una mayor proporción de AOA en ambientes con menores cantidad de amonio disponible, junto a otros factores tales como una mayor cantidad de oxígeno disuelto, carga orgánica y temperaturas extremas respecto a las AOB (Yin *et al.*, 2018).

Tabla 1. Principales organismos nitrificantes (bacterias amonio-oxidantes AOB, nitrito-oxidantes NOB y arqueas amonio-oxidantes AOA).

Filo (Perteneencia)	Género, (número de especies a la fecha)	Referencias
AOB – bacterias amonio-oxidantes		
β -proteobacteria	<i>Nitrosospira</i> , (4 especies)	Koops & Pommerening-Röser, 2015a; Garbeva <i>et al.</i> , 2007; Norton <i>et al.</i> , 2008
β -proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> (12 especies)	Koops & Pommerening-Röser, 2015b; Keluskar & Desai, 2013; Pommerening-Röser, <i>et al.</i> , 1996
γ -proteobacteria	<i>Nitrosococcus</i> (5 especies)	Koops & Pommerening-Röser, 2015c; Campbell <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2016b
NOB – bacterias nitrito-oxidantes		
α -proteobacteria	<i>Nitrobacter</i> (4 especies)	Spieck & Bock, 2015a; Vadivelu <i>et al.</i> , 2006; Tsai & Tuovinen, 1989; Huang <i>et al.</i> , 2010
β -proteobacteria	<i>Nitrospina</i> (2 especies)	Spieck & Bock, 2015b; Yepsen <i>et al.</i> , 2019; Sun <i>et al.</i> , 2019
γ -proteobacteria	Candidatus <i>Nitrotoga</i> (2 especies)	Kitzinger <i>et al.</i> , 2018; Lücker <i>et al.</i> , 2015; Ishii <i>et al.</i> , 2017; Boddicker & Mosier, 2018.
γ -proteobacteria	<i>Nitrococcus</i> (1 especies)	Spieck & Bock, 2015c; Füssel <i>et al.</i> , 2017
Nitrospirae	<i>Nitrospira</i> (11 especies)	Spieck & Bock, 2015d; Maixner <i>et al.</i> , 2006; Cébron & Garnier 2005
Chloroflexi	<i>Nitrolanceus</i> (<i>Nitrolancea</i>) (1 especie)	Sorokin <i>et al.</i> , 2014
AOA – arqueas amonio-oxidantes		
Thaumarchaeota	<i>Nitrososphaera</i> (3 especies)	Kerou <i>et al.</i> , 2016; Tourna <i>et al.</i> , 2011; Reyes <i>et al.</i> , 2020
Thaumarchaeota	<i>Nitrosopumilus</i> (9 especies)	Qin <i>et al.</i> , 2016; Walker <i>et al.</i> , 2010; Nakagawa & Stahl, 2013
Thaumarchaeota	Candidatus <i>Nitrosotalea</i> (4 especies)	Prosser & Nicol, 2016; Lehtovirta-Morley <i>et al.</i> , 2013; Lehtovirta-Morley <i>et al.</i> , 2016

Los géneros *Nitrobacter* y *Nitrospira* son considerados como los principales microorganismos que contribuyen a la oxidación de nitritos en suelos y ecosistemas terrestres, teniendo diferentes estrategias respecto a la cantidad de nitrito que ocurre en el ambiente: se ha sugerido que las especies pertenecientes al género *Nitrobacter* requieren de una alta concentración de sustrato y baja afinidad por el oxígeno, mientras que los miembros de *Nitrospira* necesitan una baja concentración de nitrito con altas concentraciones de oxígeno (Daims *et al.*, 2016). Además, se ha sugerido que la baja afinidad por nitrito que posee *Nitrospira sp.* le conferiría una ventaja adaptativa frente a *Nitrobacter*, en condiciones donde hay limitación de nutrientes (Nowka *et al.*, 2015).

1.4 El género *Nitrobacter*.

El género *Nitrobacter* Winogradsky 1892 (α -proteobacteria, orden Rhizobiales) (Spieck & Bock, 2015a), agrupa a aquellas bacterias quimiolitioautótrofas aeróbicas facultativas que utilizan como fuente de energía la oxidación del nitrito a nitrato en condiciones aeróbicas, fijando CO_2 mediante el ciclo de Calvin. Sin embargo, se ha documentado también crecimiento heterotrófico y mixotrófico en algunas cepas y especies dentro del género (Strecker *et al.*, 1994). El género *Nitrobacter* ha sido considerado como el género de bacterias nitrito-oxidante de suelo más común a nivel mundial y las especies más comúnmente estudiadas son *N. agilis* y *N. winogradskyi* (Degrange *et al.*, 1997).

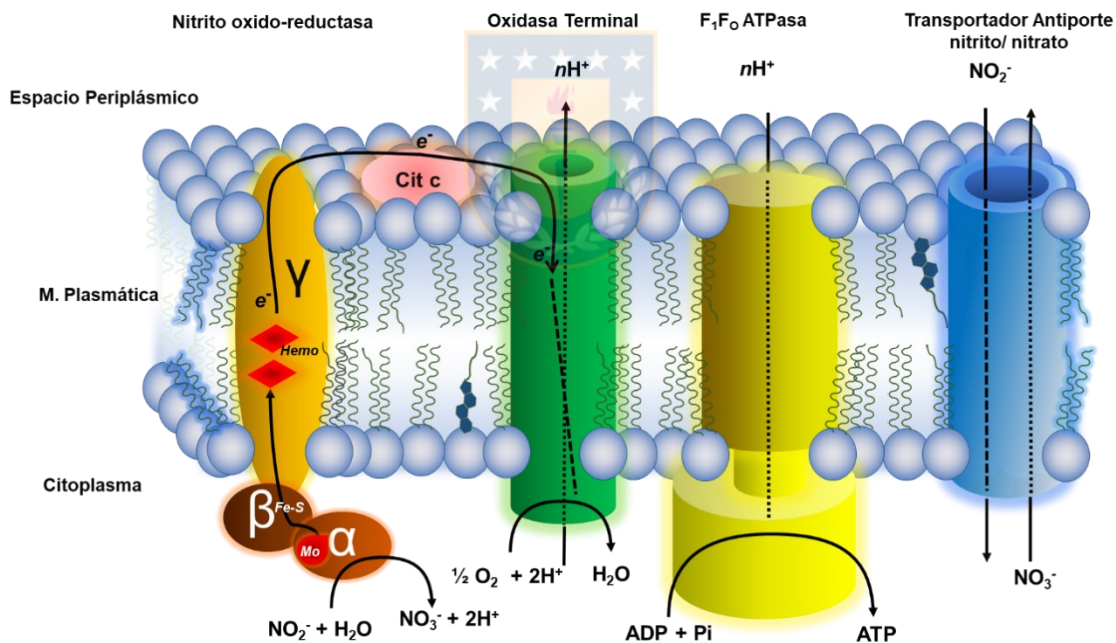


Figura 1. Cadena transportadora de electrones de *Nitrobacter winogradskyi*. Los rombos rojos en el interior de la subunidad gamma denotan a grupos hemo, el círculo en el interior de la subunidad alfa denota a molibdopterina. Adaptado desde Daims *et al.*, 2016.

1.5 Respiración bacteriana y cadena transportadora de electrones de *Nitrobacter winogradskyi*.

Desde un punto de vista fisiológico, la enzima nitrito oxidorreductasa (NXR) es la enzima más importante de *N. winogradskyi* (Starkenburger *et al.*, 2008), siendo parte fundamental de la respiración bacteriana ya que es la enzima principal del proceso de oxidación de nitritos. El complejo NXR está orientado hacia la cara citoplasmática, existiendo dos subunidades pequeñas, α y β (citoplasmáticas), que conforman un heterodímero (Spieck *et al.*, 1996), y la subunidad transmembrana gamma (γ).

En el espacio extracelular y periplásmico, el nitrito es ingresado mediante transporte antiporte pasivo nitrito-nitrato, expulsándose el nitrato como producto de la oxidación. La oxidación del nitrito ocurre mediante NxrA (α), que es el primer componente encargado de la migración de electrones: la subunidad alfa contiene la molibdopterina (donde el molibdeno está coordinado con un grupo ditiolato de piranopterina), para luego, mediante reacciones de óxido-reducción, transferir el electrón hacia la NxrB (β), que contiene una serie de grupos hierro-azufre (Fe-S), posteriormente el electrón es donado hacia la subunidad γ que contiene grupos Hemo en su interior (Kroneck & Abt, 2002).

En la cara periplásmica de la membrana plasmática, la subunidad gamma, dona un electrón al citocromo c que transfiere el electrón a la oxidasa terminal, que transloca el electrón al aceptor final de electrones (O_2), a su vez, translocando protones desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico. Finalmente, la concentración de protones acumulada en el espacio periplásmico es utilizada para la generación de ATP mediante la ATPasa.

La orientación de la enzima NXR (hacia la cara citoplasmática) es considerada desfavorable desde el punto de vista energético, ya que valores de pH alcalinos y neutros, el nitrito se presenta como un anión. Además de esto, se ha observado que la formación de NADH solo ocurre a bajas presiones parciales de oxígeno, y que sería un proceso independiente, al menos temporalmente, de la generación de ATP (Bock & Wagner, 2006). Se acepta que existirían dos modos de funcionamiento de la cadena transportadora de electrones: una clásica, donde el transporte de electrones permitiría la generación de ATP (figura 1) a partir de la oxidación de nitritos, y otra, reversa, donde el citocromo c donaría electrones para la generación de NADH (Freitag & Bock, 1990), sin embargo, aún no está claro como ocurre este proceso.

El tiempo de duplicación celular de especies de *Nitrobacter* en condiciones de laboratorio varía entre 39 a 8 horas y tasas de crecimiento de entre $0.018-0.088 \text{ h}^{-1}$ (Prosser, 1990), esto se debe a que la estrategia de crecimiento estaría orientada a maximizar la utilización de recursos, debido a los bajos rendimientos energéticos durante la oxidación de nitritos. A modo de comparación, mientras que en el primer paso de la nitrificación posee un rendimiento energético más alto ($\Delta G^{\circ} = -275 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NH}_3$, el proceso de oxidación de nitritos posee un rendimiento mucho menor ($\Delta G^{\circ} = -74 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NO}_2^-$).

Desde un punto de vista filogenético, la enzima NXR está vinculada a la familia de nitrato reductasas (nirK) encontradas en otros microorganismos (Kirstein & Bock, 1993); sin embargo, hoy se agrupan en dos familias, siendo la enzima NXR de *Nitrobacter* clasificada actualmente como tipo NAR (*nitrate reductase-like*), mientras que, el género *Nitrospira* (el

otro género más importante en la oxidación de nitritos, luego de *Nitrobacter*), posee la enzima NXR orientada hacia la cara citoplasmática, perteneciendo a la familia de enzimas DMSO-reductasas de tipo II (tipo DMR).

Esto tiene importantes consecuencias, ya que existen diferencias de afinidad por sustrato entre géneros: la enzima NXR de *Nitrobacter* es más afín por su sustrato que la enzima NXR de *Nitrospira* ($K_m(\text{NO}_2^-) = 49\text{-}544 \mu\text{M}$ para NXR en *Nitrobacter* versus $K_m(\text{NO}_2^-) = 9\text{-}27 \mu\text{M}$ para NXR en *Nitrospira*) (Nowka *et al.*, 2015), y se ha sugerido que esta sería una de las causas de las diferencias de abundancia de ambos géneros observados en hábitats de alta cantidad de nitritos (mayor abundancia de *Nitrobacter*) y menor cantidad de nitritos (mayor abundancia de *Nitrospira*). Esto ha planteado la hipótesis que existen diferentes estrategias de reproducción entre las distintas especies de NOB, sin embargo, aún queda sin resolver como podría afectar la cantidad de O_2 y CO_2 a la abundancia de estos diferentes géneros de NOB en el suelo (Daims *et al.*, 2016).

Así, la estrecha cooperación entre NOB, AOB y AOA generaría una dependencia metabólica por sus sustratos, siendo estos inhibitorios o estimulantes de la actividad bacteriana dependiendo de su disponibilidad (Yin *et al.*, 2018). El estrecho vínculo entre estos organismos, ha sido visualizado en la cercanía física que estas poseen (ya que usualmente comparten su nicho microbiano), así como el uso compartido de autoinductores y sideróforos, especialmente entre AOB y NOB (Arp & Bottomley, 2006).

1.6 Efectos de compuestos químicos de origen antrópico sobre la nitrificación.

Los organismos nitrificantes poseen una alta sensibilidad a compuestos químicos, porque sus cadenas transportadoras de electrones son lábiles y se ven afectadas por agentes químicos, y se ha constatado esto en estudios realizados en suelo (Bundy & Bremner, 1973). Sin embargo, el estudio de los efectos generados por agentes químicos sobre organismos nitrificantes es un desafío porque la mayoría de estos organismos poseen requerimientos fisiológicos complejos que dificultan su cultivo en laboratorio (Maia & Moura, 2014).

Así, los estudios se han concentrado en ensayar compuestos químicos de origen antrópico para observar sus efectos sobre el crecimiento y actividad de organismos nitrificantes en suelo, en biorreactores, y en plantas de tratamientos de aguas servidas. Por ejemplo, se ha observado que algunos ftalatos e hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden inhibir la nitrificación en sistemas de tratamiento de aguas servidas (Dokianakis *et al.*, 2006), y se ha sugerido que algunas bacterias amonio oxidantes serían capaces de degradar cometabólicamente a tricloroetileno de forma no específica (Kocamemi & Çeçen, 2010).

Por otra parte, otros compuestos asociados a residuos líquidos domiciliarios, como naproxeno, ibuprofeno y eritromicina, también serían capaces de afectar la nitrificación de sistemas de eliminación de aguas servidas (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2014); y se ha observado que otros compuestos como azidas, cianuro, dicumarol y quinacrina son capaces de generar una disminución de la producción de NAD(P)H pero aumentando el consumo de oxígeno en bacterias nitrito oxidantes (Woznica *et al.*, 2013).

En un contexto de suelo agrícola, se ha sugerido que hidrocarburos podrían estimular la producción de nitratos, indicando que los suelos contaminados pueden tener mayores potenciales de nitrificación y, por ende, generar una mayor movilización de nitrógeno (Deni & Pennickx, 1999), esto es importante al considerar la aplicación de fertilizantes nitrogenados en agricultura.

Además, los efectos de la aplicación de fertilizantes sobre la nitrificación han sido evaluados. Por ejemplo, se tiene constancia de los incrementos en la tasa de acumulación de nitritos y nitratos en suelos luego de la aplicación de fertilizantes (Hauck & Stephenson, 1965, Jones & Hedlin, 1970). Además, la acumulación de nitritos en suelo puede generar efectos adversos sobre el rendimiento de cultivos (Oke, 1966; Phipps & Cornforth, 1970), y generar cambios en la actividad microbiana (Bancroft *et al.*, 1979).

Así, los efectos no deseados de la aplicación de fertilizantes y el potencial de nitrificación condujeron a la incorporación de compuestos químicos capaces de controlar o inhibir la nitrificación de forma transitoria. Podemos resumir a los principales agentes que afectan la nitrificación en suelos en 5 grandes grupos: 1) fertilizantes, 2) plaguicidas, 3) inhibidores de nitrificación, 4) derivados de degradación y 5) metales pesados.

1.7 Incremento de la carga de nitrógeno en el suelo por uso de fertilizantes nitrogenados y sus efectos sobre la nitrificación.

Pese a los beneficios del uso de fertilizantes, el aumento de la carga de nitrógeno en suelos por el empleo intensivo de estos ha generado una serie de problemas, como la acidificación de los suelos, donde se sobrepasa la capacidad de carga de nitrógeno del suelo generada de forma natural por microorganismos y la materia orgánica contenida.

Si bien, la reducción del pH en el suelo puede ocurrir de forma natural (Wallace, 1994), el aumento de la presencia de sales y una reducción de la capacidad de intercambio catiónico de iones calcio y magnesio son los efectos más perjudiciales de la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados. Se ha sugerido que la pérdida del intercambio catiónico puede ser irreversible, afectando directamente en la nutrición vegetal (Barak *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 2011). Así, se ha propuesto cambiar las prácticas de aplicación de abono y fertilización (especialmente la aplicación de cal junto a fertilizantes nitrogenados) para evitar el deterioro de la capacidad natural de intercambio iónico del suelo y, por ende, las pérdidas económicas asociadas (Goulding, 2016).

La volatilización del amoníaco es otro problema asociado al uso de fertilizantes nitrogenados, tratamiento de purines y aplicación de estiércol de origen animal (Bussink & Oenema, 1998). Se ha sugerido que (en orden decreciente) el ganado vacuno, porcinos, gallinas ponedoras y *Broiler* serían principales contribuyentes de emisiones de amoníaco a la atmósfera, por otra parte, el ranking de emisión de fertilizantes nitrogenados sería (en orden) sulfato de amonio, urea y nitrato de amonio (Zeng *et al.*, 2018).

Otro problema asociado a la aplicación de fertilizantes nitrogenados, es el excesivo aporte de nutrientes hacia cuerpos de agua continentales y marinos desde cuencas de ríos con agricultura extensiva. La pérdida de nitratos se genera de forma difusa a través de cuencas de ríos y sus aportes generan un enriquecimiento de nutrientes en zonas lacustres y marinas.

Durante este proceso, se genera eutroficación, condición donde una mayor disponibilidad de nutrientes genera un aumento de la actividad biológica general y una mayor cantidad de materia orgánica (Howarth & Marino, 2006).

Los efectos pueden ser a largo plazo, por ejemplo, en países como Dinamarca, el control desde 1980 de las emisiones de nitrato hacia el mar ha generado una disminución de la descarga total de nitrógeno inorgánico disuelto, sin embargo, la condición de eutroficación aún es considerada como regular para gran parte de la zona costera del país (Andersen *et al.*, 2014).

Durante el proceso de eutrofización, existe un aumento en la presencia de especies oportunistas, junto a eventos de anoxia, hipoxia y proliferación de algas nocivas (Le Moal *et al.*, 2019) que generan importantes daños ambientales representando importantes costos de reparación para gobiernos e instituciones.

Como solución a estos problemas, se ha sugerido usar inhibidores de nitrificación (productos químicos que generan inhibición de la actividad nitrificante en microorganismos) para el control de la fuga de nitrógeno potencialmente aprovechable por cultivos. Los inhibidores de nitrificación pueden servir para mitigar la fuga de nitrógeno tanto a la forma de nitrógeno inorgánico (nitratos) y para controlar las emisiones de óxidos de nitrógeno asociadas (Di & Cameron, 2016). Así, los inhibidores de la nitrificación han sido reconocidos como N-estabilizadores (Amberger, 1986), y se ha sugerido que son, sino uno de los principales instrumentos de reducción del input de origen antrópico de nitrógeno, además de contribuir a aumentar beneficios económicos y ambientales (Qiao *et al.*, 2015).

Sin embargo, la pérdida de nitrógeno puede también ocurrir por la volatilización del amonio (amoníaco), así, se ha indicado que los inhibidores de ureasa pueden contribuir al control de este proceso (Cantarella *et al.*, 2018). Por otra parte, pese a que la vida media de los inhibidores de nitrificación puede ser relativamente corta, se ha considerado reemplazar su uso por alternativas más coherentes con el medio ambiente.

Otros antecedentes han señalado que la inhibición biológica de la nitrificación (generada por plantaciones forestales) puede afectar la abundancia de oxidantes de nitrito (Laffite *et al.*, 2020). Así, se ha sugerido usar inhibidores de origen biológico (químicos de origen natural) de la nitrificación, siendo principalmente derivados de exudado radicular de diversas plantas (Coskun *et al.*, 2017). También se ha observado que el uso de fertilizantes nitrogenados junto a biochar (carbón vegetal usado para fines agrícolas) pueden generar un estímulo en la abundancia de AOB y no de AOA (Bi *et al.*, 2017), por otra parte, el uso de fertilizantes puede incrementar el potencial oxidante de nitritos en el suelo, como resultado de un cambio en la abundancia de *Nitrobacter* y *Nitrospira* (Han *et al.*, 2018), pero, también se señala que la proporción de ambos géneros sería fundamentalmente afectada por el pH del suelo, el nitrógeno total y el contenido de materia orgánica del suelo (Han *et al.*, 2018). Estos resultados sugieren que los regímenes de introducción de nitrógeno al que pueden ser sometidos los suelos pueden alterar las comunidades bacterianas, así se ha planteado que la nitrificación en ambientes ricos en nutrientes es principalmente conducida por arqueas oxidantes del amonio (AOA) y por bacterias oxidantes del nitrito de baja afinidad por sustrato (*Nitrospira*), mientras que en ambientes sometidos a alta carga de nitrógeno, los grupos dominantes serían AOB (principalmente *Nitrosomonas*) y NOB (principalmente *Nitrobacter*).

1.8 Nitrificación en nutrición vegetal.

Uno de los elementos fundamentales para nutrición vegetal es el nitrógeno, que puede ser adquirido por las plantas a partir de tres especies químicas de nitrógeno: amonio, nitrato y urea (Witte, 2011), o fijado simbióticamente a partir del nitrógeno atmosférico (Garg & Geetanjali, 2009). La mantención del equilibrio entre estas especies nitrogenadas en el suelo es fundamental para el crecimiento de cultivos en agricultura, ya que existen preferencias de adquisición dependiendo de la especie vegetal; por ejemplo, se ha señalado que la caña de azúcar, maíz y trigo tienen preferencia de adquisición por el nitrato, mientras que en cultivos de arroz (*Oryza sativa*) habría una preferencia de adquisición por el amonio (Kronzucker *et al.*, 1999; Tabuchi *et al.*, 2007).

Se ha hipotetizado que el mecanismo detrás de estas preferencias serían diferencias de sensibilidad al ion amonio, especie química que causaría perturbación del pH citosólico, generando una alteración en la tasa de generación de carbohidratos, como producto de un desacoplamiento de la fosforilación y cambios en las concentraciones de cationes divalentes (Britto & Kronzucker, 2002; Liu & von Wirén, 2017). Mientras que los iones amonio son absorbidos mediante transportadores de amonio, la adquisición de nitrato es realizada por medio de transportadores que están sometidos bajo una compleja red de regulación (Zhao *et al.*, 2018). Así, se ha señalado que existe sinergismo en el equilibrio de nitrato y amonio para nutrición vegetal, beneficiando el crecimiento vegetal (Hachiya & Sakakibara, 2016). Entre los factores que afectan la asimilación de nitratos y amonio destacan la radiación ultravioleta, volatilización del nitrógeno en suelo, presencia de metales y de sales pueden afectar la asimilación de nitratos y amonio en plantas (Mokhele *et al.*, 2012). Además, la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) es una fuente no menos importante de nitrógeno en cultivos, ya que puede ser transformado a amonio mediante la actividad ureasa de algunos microorganismos (Sigurdarson *et al.*, 2018), aunque algunas especies vegetales son capaces de adquirir urea directamente (Mérigout *et al.*, 2008).

Pese a que se conocía que la nitrificación podría ser estimulada por una mayor cantidad de fertilizantes amoniacales (Broadbent *et al.*, 1957), el desarrollo de inhibidores de nitrificación comenzó tardíamente (Huber *et al.*, 1977): estos compuestos ralentizan o detienen dicho proceso, con el fin de estabilizar la cantidad de nitrógeno amoniacal, sin embargo, en desmedro de la actividad nitrificante del suelo, afectando la producción natural de nitratos.

1.9 Inhibidores de nitrificación.

El primer paso de la nitrificación es realizado mayoritariamente por *Nitrosomonas*, que puede ser inhibida por compuestos químicos empleados intencionalmente para evitar la generación de nitritos y nitratos en los suelos, aprovechando la máxima biodisponibilidad del amonio para nutrición vegetal. Durante la aplicación de fertilizantes nitrogenados, la adquisición de nutrientes por parte de plantas es deficiente, generando entre un 50 a 70% de pérdidas de nitrógeno en el suelo (Singh & Verma, 2007). Por esto, se desarrollaron inhibidores de nitrificación, productos químicos que tienen actividad inhibitoria de la nitrificación (cuya diana principal es la enzima amonio monooxigenasa de *Nitrosomonas*), o actividad ureasa. Estos son aplicados al suelo para aumentar la asimilación de nutrientes en vegetales. Sin embargo, pese a su probada efectividad, existe controversia sobre la seguridad de algunos inhibidores de nitrificación dada la naturaleza compleja del suelo

(Dougherty *et al.*, 2016; Alfaro *et al.*, 2018), existiendo preocupaciones sobre su persistencia en suelos y su disipación hacia lugares aledaños (McCarty & Bremner, 1990b).

En esta categoría de inhibidores de nitrificación (IHN), destacan los compuestos Nitrapyrin (2-cloro-6-(triclorometil) piridina), Tiourea (Tiocarbamida) (Wang *et al.*, 2017b), Dicianamida cianoguanidina (DCD), 2-amino-4-cloro metil pirimidina (Slangen & Kerkhoff, 1984), 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) y mezcla isomérica de ácido succinil 2-(N-3,4-dimetil-1H-pirazol-1-il) (DMPSA) (Recio *et al.*, 2019). Respecto a su clasificación, los IHN pueden ser clasificados en sulfurados (tiosulfatos, tiocarbamatos, xantatos y aminoácidos sulfurados), acetilénicos (acetileno, y compuestos con grupos etinil) y heterocíclicos (pirazoles, 1,2,4-triazoles, piridazinas, benzotriazoles, indazoles) (McCarty, 1999).

Se han buscado alternativas naturales a los inhibidores de la nitrificación desarrollados de forma industrial: diversos compuestos de origen vegetal han demostrado tener eficacia (Coskun *et al.*, 2017), donde destacan Sakuranetina, Sorgoleona (Subbarao *et al.*, 2013), Brachialactona (Subbarao *et al.*, 2009), y 1,9-Decanediol (Sun *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2019). Finalmente, uno de los problemas asociados a los procesos de nitrificación y desnitrificación son las emisiones de óxidos de nitrógeno hacia la atmósfera: la aplicación de inhibidores de nitrificación en suelos agrícolas ha demostrado ser eficiente para controlar las emisiones de óxidos de nitrógeno (Di & Cameron, 2012), sin embargo, la efectividad de la aplicación de inhibidores de nitrificación es dependiente del tipo de suelo, siendo necesario evaluar el clima (especialmente temperaturas y precipitaciones), junto con algunas características intrínsecas de este, tales como la acidez y cantidad de materia orgánica presente.

1.10 Efectos de la contaminación por metales pesados sobre la nitrificación.

La contaminación por metales pesados es otro problema que afecta a los suelos, y que a diferencia de los plaguicidas (que pueden ser degradados o desestabilizarse con mayor facilidad), estos pueden acumularse y residir durante un periodo de tiempo indefinido, solo siendo transformados hacia estados de oxidación menos tóxicos. Además de esto, la contaminación por metales puede inhibir la biodegradación de otros compuestos orgánicos, como los plaguicidas (Wuana & Okieimen, 2011).

Las principales fuentes de metales pesados en suelos agrícolas son las formulaciones de plaguicidas comerciales, donde destacan el *Caldo Bordelés* (que contiene sulfato de cobre y cal hidratada) y el oxiclورو de cobre, los cuales son aplicados en spray para combatir la presencia de hongos en diversos cultivos. Por otra parte, los biosólidos y purines también son fuente de metales pesados en agricultura, ya que las dietas del ganado pueden generar bioacumulación de metales pesados; esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando se agrega cobre inorgánico o quelado en la dieta de cerdos (EFSA Panel, 2016; Liao *et al.*, 2018).

En un contexto de nitrificación, por ejemplo, se ha observado que los productos Cuprafor Micro® (oxiclورو de cobre) y Swing® Gold, son capaces de generar efectos adversos en diferentes procesos metabólicos de suelo mediados por microorganismos, siendo la nitrificación el más afectado (Bart *et al.*, 2019); para estos casos, se ha sugerido que el principal mecanismo que afecta la nitrificación sería la liberación del ion cobre y su secuestro por parte del amonio, generándose sales de amonio (Lee *et al.*, 1997).

Los efectos de la exposición a metales pesados pueden variar dependiendo de su tipo: por ejemplo, existen diferencias de umbrales de concentración para generar un cambio transcripcional de los genes *amoA* (amonio monooxigenasa), *hao* (hidroxilamina oxidorreductasa) y *nirK* (nitrato reductasas) cuando se exponen a Zn(II), Ni(II), Cd(II) y Pb(II) (Kapoor *et al.*, 2015).

También se ha observado que la exposición a cadmio puede generar una respuesta a estrés, disminuyendo la expresión del gen *amoA* en *N. europaea*, atribuyéndose a un aumento del estrés oxidativo (Chandran & Love, 2008), por otra parte, se sugirió que la importación de iones cadmio es a través de canales Mg^{2+} y Ca^{2+} en *N. europaea* (Radniecki *et al.*, 2009).

También, se ha observado que, cuando *N. europaea* se expone a 3.4 μM de $ZnCl_2$ hay una disminución del consumo de oxígeno y de la producción de nitritos. (Park & Ely, 2008a). Sin embargo, otro antecedente señala que la aplicación de bajas concentraciones de plata (Ag) en el suelo son capaces de generar estimulación de la nitrificación (Langdon *et al.*, 2014), lo que se asocia a un proceso de hormesis (Calabrese & Baldwin, 2002).

Finalmente, los efectos de metales pesados sobre la nitrificación tienen importancia en contextos de plantas de tratamiento de aguas servidas, ya que la inhibición de la nitrificación puede generar efectos negativos en el tratamiento del amonio en aguas residuales (Li *et al.*, 2016).

1.11 Nanopartículas: definición

Las nanopartículas, son definidas como “aquellos nano-objetos con sus tres dimensiones externas en el rango de entre 1 a 1000 nm (nanoescala)” según la *British Standards Institution* (Jeevanandam *et al.*, 2018), y caben dentro de la categoría de nanomateriales (por definición, un objeto que posee al menos una dimensión en escala nanométrica).

Por convención, se entiende que las nanopartículas poseen una forma redondeada, con sus dimensiones aproximadamente iguales entre sí, a diferencia de nanofibras (donde una de las dimensiones no está en la escala nanométrica), nanobarras (donde una de las dimensiones está en la escala nanométrica pero mayor a las dos restantes regulares) o nanocapas (donde solo una de las dimensiones está en la escala nanométrica). En este contexto y para fines prácticos, se considerará como nanopartículas solo a estructuras de origen antrópico, ya que existen nanopartículas de origen biológico (virales/bacterianas) y de origen abiótico (Kinnear *et al.*, 2017).

Entrando en mayores detalles sobre la clasificación de las nanopartículas, éstas pueden ser organizadas en 4 grandes categorías: 1) Nanopartículas inorgánicas (constituidas por óxidos metálicos y metales), 2) nanopartículas orgánicas (constituidas por compuestos orgánicos), 3) nanopartículas compuestas (que poseen múltiples capas de compuestos diferentes, ya sean metal-orgánicas u orgánicas-orgánicas) y 4) nanopartículas basadas en carbono (por ejemplo, grafito o grafeno) (Jeevanandam *et al.*, 2018).

Por otra parte, las nanopartículas ejercen su actividad química dependiendo de múltiples factores: razón superficie/área, regularidad, tamaño, agregación, concentración, dosis y tiempo de exposición, nivel de funcionalización, estructura cristalina y

reactividad/estabilidad respecto al medio. Tomando en cuenta la diversidad de formas, tamaños y los factores que afectan su actividad química, se ha hecho necesario entender la relación entre estos elementos y sus efectos sobre la actividad biológica, para así establecer criterios de seguridad de uso (Nel *et al.*, 2009).

Respecto a sus usos, las nanopartículas comenzaron a ser utilizadas si no se hubieran utilizado en aplicaciones industriales, para luego ser empleadas en agricultura. Entre sus principales efectos sobre los vegetales destacan cambios en la actividad enzimática, contenido de clorofila y metabolitos secundarios. Entre sus principales usos destacan fertilizantes, estimulantes vegetales, sensores y plaguicidas (Paramo *et al.*, 2020).

1.12 Nanopartículas metálicas y Nanopartículas de óxidos metálicos.

Algunas de las aplicaciones de las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos es la generación de sensores de gases ambientales, catálisis y electrónica (Chavali & Nikolova, 2019) y cosméticos (en el caso de nanopartículas de ZnO y TiO₂) (Lu *et al.*, 2015). También se ha sugerido que las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos pueden tener actividad antiinflamatoria, especialmente nanopartículas de plata, oro y de óxido de zinc (Agarwal *et al.*, 2019). Además, las nanopartículas de otros metales de transición, pueden ejercer diversos efectos tóxicos sobre microorganismos, teniendo propiedades antibacterianas y antifúngicas que pueden ser consideradas beneficiosas desde un punto de vista de control de patógenos; además se ha observado que ejercen citotoxicidad en cultivos de células humanas inmortalizadas (Seabra & Durán, 2015).

Desde un punto de vista agroambiental, la aplicación de nanopartículas metálicas tiene el potencial de ser explotado en su aplicación para el control de plagas, especialmente como fungicidas (Pariona *et al.*, 2019) y se ha sugerido que pueden mejorar la nutrición vegetal (El-Ramady *et al.*, 2016; 2018).

1.13 Mecanismos de acción de las nanopartículas metálicas, efectos sobre sistemas biológicos en el suelo.

Las nanopartículas metálicas pueden tener efectos variados dependiendo del tipo de material, forma y comportamiento en el medio acuoso (Pal *et al.*, 2007), y se ha sugerido que el principal mecanismo de acción sobre los organismos es la producción de ROS en el interior de las células (Rajput *et al.*, 2018a; Gajjar *et al.*, 2009), generándose respuestas a estrés por metales pesados (Quinteros *et al.*, 2016).

Sin embargo, los mecanismos bactericidas de las nanopartículas aún no han sido bien dilucidados, existiendo tres hipótesis sobre los mecanismos ejercidos: 1) el estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno en el interior citoplasmático, 2) los iones metálicos afectarían los procesos fisiológicos como generación de ATP por un cambio en el gradiente electroquímico, 3) la ruptura de membranas celulares debido a la penetración e interacción directa con la superficie de la nanopartícula (Mamonova *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016).

En cuanto a los efectos biológicos observados de nanopartículas metálicas en el suelo, destacan cambios en el crecimiento vegetal (Shah & Belozerova, 2009; Yoon *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2016), efectos sobre crustáceos e insectos (Manzo *et al.*, 2011), y efectos sobre invertebrados de suelo (Tourinho *et al.*, 2012), así, se ha sugerido que el 99% del contenido total de nanopartículas metálicas aplicadas puede ser absorbido por pequeños organismos, sugiriéndose que hay un potencial riesgo de bioacumulación de metales pesados (Golobič *et al.*, 2012).

Debido a que los organismos más cercanos a las dimensiones de las nanopartículas son los microorganismos (bacterias, arqueas, hongos y otros eucariontes unicelulares), estos son los organismos más susceptibles a sus efectos. Por ejemplo, se ha observado que las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) pueden generar cambios en la diversidad y composición de la comunidad microbiana de suelo a una concentración de 100 mg/kg (Zhai *et al.*, 2019), y que este tipo de cambios en la comunidad microbiana son más acentuados ante la exposición de CuONPs cuando se comparan sus efectos con nanopartículas de óxido de hierro (III) (Fe₂O₃NPs) (Ben-Moshe *et al.*, 2013). Otros estudios señalan que Fe₂O₃NPs podría mejorar la actividad metabólica microbiana, mientras que las nanopartículas de plata (AgNPs) tendrían un efecto inhibitorio, a concentraciones de entre 1 a 10 mg/kg de suelo (He *et al.*, 2016). También se ha señalado que las nanopartículas de óxido de aluminio (Al₂O₃) tendrían efectos menos pronunciados sobre estructura comunitaria bacteriana cuando se compara con AgNPs (McGee *et al.*, 2017), además, las AgNPs podrían afectar la ecología funcional bacteriana, alterando procesos, como la nitrificación (Wang *et al.*, 2017a). Por otra parte, las nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂NPs) tendrían efectos sobre la mineralización del carbono, pero no sobre las comunidades microbianas (Simonin *et al.*, 2015). Como ya se había mencionado, los principales efectos de nanopartículas metálicas sobre microorganismos son producto de un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de hidróxidos metálicos, sin embargo, la presencia de estos fenómenos depende de la fuerza iónica del medio, del tamaño y carga de la superficie de la nanopartícula, de la materia orgánica presente y de las dimensiones de las nanopartículas (Schwegmann & Frimmel 2010).

Aunque hipotéticamente las nanopartículas metálicas afectan a los microorganismos del suelo por diferentes mecanismos en comparación con metales pesados, aún existen discrepancias por resolver: por ejemplo, los efectos de metales pesados sobre microorganismos son relativos a la concentración de estos en el medio, pero, pueden producirse resultados contradictorios debido a que la biodisponibilidad en los suelos puede ser diferente de las concentraciones ensayadas en laboratorio, debido a las complejas reacciones químicas que recaen sobre los iones metálicos. Así, se hace necesario poder contar con herramientas de predicción de biodisponibilidad de metales pesados en suelos, y estimar las concentraciones adecuadas para su evaluación en laboratorio (Giller *et al.*, 2009).

1.14 Sobre el destino ambiental de las nanopartículas metálicas y sobre la presencia de nanopartículas en el suelo.

Las fuentes de nanopartículas metálicas hacia el medio ambiente pueden ser clasificadas como intencionales (por ejemplo, fertilizantes, plaguicidas o remediación) o no-intencionales (desechos industriales, emisiones de automóviles, residuos cosméticos). Una vez en el ambiente, las nanopartículas pueden ser retenidas en el suelo o transportadas por cauces y depositadas en sedimentos, sin embargo, el destino ambiental y sus efectos sobre los ecosistemas son aún desconocidos. Posteriormente, las nanopartículas son sometidas a una serie de transformaciones fisicoquímicas que pueden incidir en su reactividad. Si bien las nanopartículas se presentan de forma natural en el suelo, estas se componen en su mayoría de estas por agregados de minerales y materia orgánica, conformando agregados coloidales orgánicos (Theng & Yuan, 2008).

Cuando las nanopartículas metálicas llegan al suelo, son sometidas a transformaciones fisicoquímicas como óxido-reducción, ad/absorción, disolución, dispersión y agregación. La intensidad de estas transformaciones está influenciada por el pH del suelo, cantidad de materia orgánica presente, iones presentes, nivel de hidratación y coloides, que finalmente definen su comportamiento (Chen, 2018). Debido a su gran área/superficie, estas pueden interactuar y reaccionar fácilmente con moléculas externas, lo cual puede tener impacto en la biodisponibilidad de contaminantes en el suelo (Theng & Yuan, 2008). De esta forma, las nanopartículas son potenciales candidatos para preconcentración de agentes químicos considerados perjudiciales, inhibiendo su actividad química por medio de la adsorción de los compuestos químicos hacia su superficie (proceso conocido también como nanoremediación) (Kaur & Gupta, 2009).

Las nanopartículas metálicas también son capaces de interactuar electrostáticamente con la materia orgánica, generando complejos de agregación que pueden interferir con el balance de nutrientes y la actividad enzimática del propio suelo, alterando la dinámica de los procesos biogeoquímicos (Javed *et al.*, 2019). Por ejemplo, se ha señalado que nanopartículas de óxido de hierro pueden generar la acumulación de metales pesados en sus inmediaciones en presencia de ácidos húmicos y fúlvicos, lo cual puede ser considerado algo positivo en la remoción de metales pesados, sin embargo, otros nutrientes pueden ser afectados durante la remoción (Tang *et al.*, 2014). En el caso de CuONPs, se ha sugerido que junto con el ácido húmico se puede generar adsorción o floculación con especies de aluminio (III) disueltas en el medio (Chu *et al.*, 2016). De esta forma, se ha sugerido que las nanopartículas pueden hetero-agregarse a coloides del suelo, existiendo una gama de resultados finales dependiendo de los factores ya mencionados (El Hadri *et al.*, 2018), sin embargo, aún falta por evaluar muchas de las nanopartículas metálicas creadas actualmente, especialmente respecto a sus dimensiones (Rajput *et al.*, 2020).

Conocer el estado ambiental de nanopartículas de origen antrópico es un desafío y actualmente no existe un procedimiento estándar para cuantificarlas *in-situ* (Schwertfeger *et al.*, 2017). Sin embargo, se han generado diferentes metodologías para la detección de nanopartículas metálicas de plata (Mahdi *et al.*, 2017), nanopartículas de oro (Gao *et al.*, 2020) y nanopartículas de cobre (Navratilova *et al.*, 2015), donde el procedimiento general consiste en adquirir muestras desde coloides extraídos desde suelo, y luego mediante sonicación y centrifugación, realizar la extracción de nanopartículas para ser detectadas por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Tabla 2. Factores y mecanismos que afectan el destino y comportamiento de nanopartículas metálicas

Tipo de Nanopartícula	Factores	Mecanismo	Referencias
TiO ₂	Presencia de metales pesados, NPs SiO ₂	Adsorción	Vale <i>et al.</i> , 2015; Engates & Shipley, 2011.
CeO ₂	Contaminantes, pH, Ácidos húmicos y fúlvico, aglomeración, disolución, UV	Liberación de Ce ³⁺ y Ce ⁴⁺	Pettinger <i>et al.</i> , 2020; Schwabe <i>et al.</i> , 2014; Oriekhova & Stoll, 2016
CuO	pH, Ácidos húmicos y fúlvicos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, disolución, aglomeración	Liberación de Cu ²⁺	Son <i>et al.</i> , 2015; Khan <i>et al.</i> , 2019; Peng <i>et al.</i> , 2019
Cu	pH, salinidad, presencia de cationes divalentes, (Ca ²⁺ /Mg ²⁺), fosfatos, carbonatos	Liberación de Cu ⁺	Conway <i>et al.</i> , 2015; Shah <i>et al.</i> , 2016; Arenas-Lago <i>et al.</i> , 2019; Xiao <i>et al.</i> , 2018
ZnO	Temperatura, ácidos orgánicos	Disolución de ZnO y liberación de Zn ²⁺	Reed <i>et al.</i> , 2012; Eixenberger <i>et al.</i> , 2017; Majedi <i>et al.</i> , 2014
Óxidos de Hierro (α-ε)-Fe ₂ O ₃	pH, fuerza iónica del medio	Adsorción, fuerzas electrostáticas y no-electrostáticas, coprecipitación en superficie de NP	Demangeat <i>et al.</i> , 2018
Óxidos de Aluminio (Al ₂ O ₃)	pH, fuerza iónica del medio	Adsorción, fuerzas electrostáticas	Zheng <i>et al.</i> , 2019

Nota. adaptado desde Joo & Zhao, (2017).

1.15 Efectos de nanopartículas metálicas sobre la nitrificación: el caso de la disrupción del proceso plantas de aguas servidas.

Distintos metales pesados son capaces de generar efectos adversos sobre diferentes microorganismos. Se ha constatado que las distintas formas iónicas de níquel, cadmio (Hu *et al.*, 2002; 2003), plomo, cobre (Cela & Summer, 2002), zinc y cobalto (Çeçen *et al.*, 2009) son capaces de inhibir la nitrificación.

Las nanopartículas metálicas pueden diseminar iones metálicos hacia sus inmediaciones en el medio y generar un gradiente de concentración de iones hasta alcanzar el equilibrio. Sin embargo, la presencia de distintos compuestos químicos en los medios, presencia de sales, fuerza iónica y la presencia de materia orgánica pueden generar diferentes efectos en sobre la nitrificación; por lo tanto, los efectos sobre la nitrificación pueden ser diferentes tanto por el sustrato utilizado (medio líquido o sustrato sólido), como por el estado de los metales a ensayar (en forma iónica, cerovalente, agregado o nanopartícula).

Tomando en cuenta esto, existe otro caso donde la nitrificación es relevante y su disrupción puede ser perjudicial: en las plantas de tratamientos de aguas servidas la nitrificación es imprescindible porque de esta forma disminuye la concentración de amonio, evitando su exceso. Se ha señalado que la eficiencia de una planta de tratamiento de aguas servidas puede verse afectada ante exposición a metales pesados, reflejándose en una disminución de la respiración bacteriana (Lember *et al.*, 2018), y que la eficiencia de la nitrificación puede verse disminuida cuando hay co-contaminación por metales pesados y compuestos orgánicos disueltos (Juliastuti, *et al.*, 2003a).

En el caso de las nanopartículas, se ha sugerido que distintos tipos de nanopartículas metálicas pueden incidir sobre la nitrificación en plantas de tratamiento de aguas servidas (Wang & Chen, 2016), reduciendo su efectividad. Un tiempo exposición de 12 horas a una concentración de 1 mg L⁻¹ de AgNPs generó una reducción del 41.4% de la actividad nitrificante en un contexto de planta de tratamiento de aguas servidas (Liang *et al.*, 2010), y también, se ha sugerido que AgNPs pueden generar un aumento de la emisión de óxido nitroso en ambientes acuáticos (Zheng *et al.*, 2017). También, se ha observado una reducción del 23.7% en la respiración nitrificante cuando se expuso a nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) a una concentración de 5 mg L⁻¹ durante 11 días (Hou *et al.*, 2013), pero se observó que CuNPs a una concentración de entre 0.1 a 10 mg L⁻¹ y durante 92 días de exposición puede generar un aumento de la remoción de nutrientes, estimulando la desnitrificación, pero reduciéndose la generación de nitritos, y por ende, disminuyendo la nitrificación (Chen *et al.*, 2012).

En mayor detalle, las CuNPs pueden generar citotoxicidad y disminución de la eficiencia del tratamiento de aguas servidas: su toxicidad estaría causada principalmente por radicales libres (ROS) que se forman a partir de la forma iónica del cobre en solución mediante una reacción catalítica intermediada por especies reducidas de cobre (Clar *et al.*, 2016). Estos efectos no son exclusivos de este tipo de nanopartícula, por ejemplo, se ha observado que AgNPs a una concentración de 1 mg L⁻¹ generarían una disminución del 90% de la actividad nitrificante, en comparación con sus formas iónicas a concentraciones similares (Choi & Hu, 2009), sin embargo, en otro estudio, se demostró que la inhibición de la actividad nitrificante puede variar entre los diferentes tipos de síntesis de AgNPs,

habiendo diferencias en los porcentajes de inhibición de la nitrificación bajo las mismas concentraciones ensayadas pero con distinto origen de preparación, y además se ha informado que los procesos de adsorción generarían gránulos de integración entre células bacterianas y nanopartículas (Yuan *et al.*, 2013).

Similarmente, se ha constatado que ZnONPs pueden generar disminución de la expresión de genes relacionados a la nitrificación (*amoA*, *hao* y *nirK*), una disminución de la adquisición de oxígeno asociada a la nitrificación y un aumento de ROS intracelular, cuando se alcanzaron concentraciones de entre 1 a 10 mg L⁻¹ de ZnONPs (Phan *et al.*, 2020). Se ha constatado también, que las ZnONPs pueden generar efectos adversos sobre *N. europaea*, acelerando el crecimiento de bacterias desnitrificantes en un contexto de lodos activos (Wang *et al.*, 2015). Otro efecto a destacar, provocado por las nanopartículas, es el aumento de las emisiones de óxidos de nitrógeno (NO_x), sugiriéndose que las nanopartículas metálicas pueden generar un efecto aún más adverso por estimulación de la emisión de NO_x, contribuyendo al calentamiento global (Zheng *et al.*, 2017).

Por lo tanto, se puede resumir que las nanopartículas metálicas son capaces de afectar la nitrificación en plantas de tratamiento de aguas servidas de forma similar a como lo hacen en el suelo, y que pueden generar un desbalance en la tasa de nitrificación/desnitrificación, generando emisiones no deseadas de óxidos de nitrógeno y alterando la tasa de remoción de amonio.

1.16 Nanopartículas de cobre metálico.

Las nanopartículas de cobre metálico, muestran un efecto similar al resto de las nanopartículas metálicas cuando son aplicadas, y se ha demostrado que sus efectos pueden ser similares a la aplicación de iones cobre (CuSO₄) sobre hongos y bacterias (Cioffi *et al.*, 2005; Bramhanwade *et al.*, 2016). Pese a que su aplicación puede ser considerada beneficiosa, ya que son eficaces agentes antibacterianos (Raffi *et al.*, 2010; Chatterjee *et al.*, 2014) y antivirales (Shionoiri *et al.*, 2012; Sucipto *et al.*, 2017), existen antecedentes que exponen potenciales efectos adversos sobre organismos no patógenos, sobre el suelo (Collins *et al.*, 2012), sus comunidades microbianas (Fernandes *et al.*, 2017) y vegetales (Shi *et al.*, 2014).

Desde un punto de vista ambiental, no queda claro el comportamiento al término de su vida útil, acumulándose en el suelo, siendo absorbidas a una mayor tasa que los iones cobre en disolución (Sekine *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha señalado que la presencia de materia orgánica podría aumentar la tasa de disolución de las nanopartículas de cobre metálico, y que la presencia de cationes divalentes podría influir sobre la estabilidad de estas, independientemente del pH (Arenas-Lago *et al.*, 2019), sugiriendo entonces, que en suelos donde se han empleado fertilizantes de forma intensiva, la capacidad de intercambio catiónico podría verse disminuida y generándose menor retención de nanopartículas.

Además, se ha observado que cambios pequeños en la relación superficie/volumen afectan a los organismos de forma diferente, siendo importante el estudio de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas para ensayos toxicológicos (Navya & Daima, 2016). Así, el estudio ambiental y toxicológico de las nanopartículas de cobre metálico puede ayudar a entender los factores que promueven mayor toxicidad, identificando aquellos que inciden en su disolución, bioacumulación y transporte.

1.17 Efectos de las nanopartículas de cobre sobre la nitrificación y la fisiología bacteriana de organismos nitrificantes en suelo.

Estudiar el efecto de las nanopartículas de cobre sobre la nitrificación es fundamental para entender sus efectos sobre la nutrición vegetal, ya que podrían ver afectadas tanto el rendimiento de cultivos como la calidad del suelo donde se aplican. En el contexto de la nutrición vegetal, algunos antecedentes señalan que el exceso de cobre puede disminuir el rendimiento de la adquisición de nitrato en *Arabidopsis* (Hippler *et al.*, 2018), y que las nanopartículas de óxido de cobre podrían generar fitotoxicidad, inhibiendo la germinación, generando cambios metabólicos y cambios morfológicos en plantas (Rajput *et al.*, 2018b). También, se ha propuesto que las nanopartículas de óxido de cobre afectarían al sistema planta-suelo: afectando a varios grupos bacterianos, tales como *Rhizobiales* y *Sphingobacteriaceae* (Frenk *et al.*, 2013).

Pese a que se conoce que la nitrificación es un proceso sensible a agentes contaminantes, en el caso de las nanopartículas de cobre, sus efectos no están dilucidados. Las principales preocupaciones generadas por el empleo de nanopartículas de cobre en agricultura tienen que ver con su uso como fungicidas (en reemplazo del tradicional sulfato de cobre) y de su uso como potenciales biorremediadores ambientales para degradar plaguicidas, debido a sus propiedades reactivas (Zin, 2016).

Respecto a los efectos sobre nitrificación, las investigaciones han estado orientadas hacia observar los efectos del ion cobre sobre el proceso general (por ejemplo, estimaciones de potencial de nitrificación), existiendo pocos antecedentes sobre organismos nitrificantes en particular: los esfuerzos de investigación toxicológica han estado orientados principalmente a evaluar los efectos de nanopartículas sobre *Nitrosomonas euroapea*, (Radniecki *et al.*, 2011).

Existen dos tipos principales de nanopartículas cúpricas: nanopartículas de cobre metálico y de óxido de cobre, las cuales tienen comportamientos diferentes en medio acuoso; en el caso de nanopartículas de cobre metálico, estas son transformadas a diferentes especies en disolución en el medio acuoso: $\text{Cu}(0) \rightarrow \text{Cu}(\text{I})_2\text{O} \rightarrow \text{Cu}(\text{II})\text{O} \rightarrow \text{Cu}(\text{II})\text{OH}_2$ (VandeVoort & Arai, 2018). Así, los primeros productos que se generarían por la oxidación de las nanopartículas de cobre metálico, serían óxidos de cobre y luego, hidróxidos. En el caso de las nanopartículas de óxido de cobre, estas serían transformadas lentamente hacia hidróxidos de cobre. Por lo tanto, dependiendo del estado de oxidación de la nanopartícula en el medio acuoso y de la composición química presente en el medio, se podrían generar diferentes efectos sobre organismos nitrificantes. La nitrificación puede ser estudiada tanto *in-vitro* como *in-vivo* en el suelo, y al ensayarse las nanopartículas puede generar diferentes resultados. De esta forma, en un contexto de nitrificación en lodos activos, se ha observado que la IC_{50} estimada para cobre disuelto sería de 117 mg L^{-1} (1.84 mM) durante la oxidación de nitritos (Liu & Wang, 2012), sin embargo, otro antecedente señala que cuando se agregó cobre metálico a una concentración de 5 mg L^{-1} (0.08 mM) generó una inhibición de la nitrificación, y cuando se realizó la simulación de especies en el medio, se sugirió que la forma $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{+2}$ (ion tetraamín cobre) sería la responsable de esta inhibición, impidiendo su uso por parte de *Nitrosomonas* en un sistema de planta de tratamiento de aguas servidas (Lee *et al.*, 2009).

Otros antecedentes señalan que se genera una inhibición completa de la nitrificación se produce a 1.2 mg L^{-1} de ion cobre (0.01 mM) (Juliastuti *et al.*, 2003b), y que, a diferencia de otros metales pesados, la adquisición de ion cobre sería rápida, estableciéndose que la viabilidad disminuye aproximadamente un 90% a una concentración de 1 mM de ion cobre (Hu *et al.*, 2003), mientras que otro reporte señala que, a una concentración $8 \text{ }\mu\text{M}$ de CuCl_2 (0.5 mg L^{-1}), se generaría una disminución del 90% de la actividad nitrificante en *N. europaea* (Park & Ely, 2008b).

Además, se ha propuesto que el cobre puede estimular la nitrificación: se ha indicado que la tasa de transformación de amonio aumenta a una concentración de 1 mg L^{-1} (0.01 mM) de nanopartículas de CuO (Zhang *et al.*, 2020), también se ha indicado estimulación de la nitrificación en sistemas de producción de agua dulce cuando hay una concentración de $0.85 \text{ }\mu\text{g/L}$ de ion cobre ($0.01 \text{ }\mu\text{M}$) (Wagner *et al.*, 2019). Similarmente, se ha sugerido que, en suelo, el Cu en estado acuoso a una concentración de 1 mg L^{-1} (0.0157 mM) muestra un efecto estimulador (9% de incremento de nitrificación sobre el control), pero mostraron efectos adversos sobre la nitrificación en un rango de entre 1 a 100 mg L^{-1} ($0.15 \text{ mM} - 15 \text{ mM}$) (VandeVoort & Arai, 2018). También se ha observado que bajas dosis de ion Cu generan una mejora en la nitrificación en presencia de agentes inhibidores de nitrificación (Gwak *et al.*, 2020). A modo de comparación, un organismo nitrificante heterotrófico, *Cupriavidus pauculus*, puede nitrificar heterotróficamente (usando como fuente de carbono al fenol) a una concentración de 1 mM de Cu (Ramírez *et al.*, 2014), poniendo en evidencia la susceptibilidad de los organismos nitrificantes.

Sin embargo, aún no están claros los márgenes de concentraciones de ion Cu o CuNPs que podrían considerarse perjudiciales para la nitrificación. En el caso de los efectos del cobre sobre la actividad amonio-oxidante de microorganismos, se ha sugerido que el principal mecanismo de acción del ion Cu sobre la nitrificación es el secuestro del amonio, generando sales (Lee *et al.*, 1997), pero se desconoce si esto ocurre durante la oxidación de nitritos. Debido a las características fisiológicas particulares de los organismos nitrificantes, estos necesitan cobre para el metabolismo: por ejemplo, *Nitrosomonas europaea* posee nitrosocianina, una enzima de la familia de las cupredoxina y que participa en la respiración celular (Arciero *et al.*, 2002), y su principal enzima, el amonio monooxigenasa pertenece a la familia de Cu-monooxigenasas de membrana (Lancaster *et al.*, 2018). Similarmente, *Nitrobacter* posee una enzima nitrato reductasa (nirK) dependiente de cobre, que participa del proceso de regulación de la cadena transportadora de electrones (Starkenbourg *et al.*, 2008).

Entrando en mayores detalles, *Nitrobacter* posee diferentes componentes donde el cobre ocupan un rol importante, como, por ejemplo, citocromo c oxidasa, que necesita de un ligando binuclear cobre (I) (cuproredoxina) (Kelly *et al.*, 1993), nitrito reductasa (cobre), superóxido dismutasa (Cu-Zn) y SCO1/SenC (Proteína de síntesis de citocromo c oxidasa). Por otra parte, existen sistemas de transporte y respuesta a cobre, tales como oxidasa cobre (CuO-like), que oxida Cu(I) a Cu(II), proteína translocadora de cobre (CopA, ATPasa tipo P homóloga a ATP7A/7B), oxidasa multicobre, permeasa de eflujo de cationes cobre (CusA-like), y aruzina azul (tipo I) con dominios cobre (Starkenbourg *et al.*, 2006). De esta forma, se puede señalar que, a partir de estos antecedentes previos, *Nitrobacter* posee en sus requerimientos nutricionales al cobre, sin embargo, el rango beneficioso de concentración puede ser acotado.

Cabe destacar que existe poca información respecto a los mecanismos de adquisición del cobre por parte de bacterias y otros microorganismos ambientales, ya que las investigaciones han estado focalizadas en la resistencia a la toxicidad de microorganismos patógenos mediante plásmidos de resistencia u otros mecanismos (Trevors & Cotter 1990; Fowler *et al.*, 2019).

1.18 Clasificación de Plaguicidas.

Un plaguicida o plaguicida se define como: “aquella sustancia química bioactiva que ejerce influencia directa o indirectamente sobre organismos no deseados con el fin de mantener la producción agrícola” (Imfeld & Vuillemier, 2012), teniendo en cuenta esto, entraremos en detalles sobre los modos de empleo y características químicas, junto a una breve discusión sobre sus efectos sobre la nitrificación.

Los plaguicidas pueden ser clasificados según su modo de acción, por el tipo de organismo considerado diana o por su composición química. Basándose en su modo de acción, los plaguicidas pueden agruparse como plaguicidas sistémicos (que penetran los tejidos y pueden ser transportados por toda la planta) o no sistémicos (que no son absorbidos por la planta). Respecto a la clasificación que considera el grupo de organismos al cual van dirigidos, esta es la clasificación más tradicional y ampliamente distribuida, siendo clasificados en insecticidas, herbicidas, miticidas (acaricidas), molusquicidas, avicidas, bactericidas y viricidas, entre otras subcategorías (Kim *et al.*, 2017). Por otra parte, se han establecido subcategorías basados en su modo de acción, de esta forma, en la categoría “herbicidas” destaca la subdivisión entre pre y post-emergentes (tomando en cuenta su tiempo de aplicación antes de la cosecha, ya sea preventivo o curativo), dentro de la categoría pre-emergente, existe la subclasificación entre controladores de pastos y controladores de amplio espectro. Por otra parte, en la categoría post-emergente, existen las categorías “selectivas”, donde la aplicación del herbicida tiene un espectro de acción estrecho, orientado a un grupo de herbáceas. Por último, existe la categoría “no selectivo” que sugiere que la acción es de amplio espectro, y que puede inhibir de modo no específico el crecimiento de hierbas no deseadas (Tadeo, 2008).

Además, las familias de plaguicidas que poseen el mismo modo de acción también son de naturaleza química similar, perteneciendo al mismo grupo de clasificación química. Así, para el control del uso y manejo de plaguicidas, se crearon los comités FRAC para control de fungicidas (Hermann & Stenzel, 2019), HRAC para control de herbicidas (Beffa *et al.*, 2019) e IRAC para control de insecticidas (Sparks & Nauen, 2015), con el objetivo de tener un sistema de clasificación para el uso racional de plaguicidas y prevención del desarrollo de resistencias y así monitorear la toxicidad ambiental.

1.19 Plaguicidas como compuestos químicos que afectan la nitrificación.

Otro factor que afecta la nitrificación son los plaguicidas en suelos agrícolas y transporte hacia aguas continentales; sus efectos varían dependiendo de su naturaleza química. Por ejemplo, mancozeb (fungicida ditiocarbamato de amplio espectro) puede alterar la producción nitratos, la diversidad microbiana y la presencia de genes *amoA* en suelos (microcosmos), pero de forma transitoria (Feld *et al.*, 2015), por otra parte, glifosato (herbicida de amplio espectro) puede alterar la dinámica de nitrificación, sin embargo, a concentraciones por encima de las concentraciones de campo (Carlisle & Trevors, 1986; Zabaloy *et al.*, 2017). Un estudio señala que el único compuesto capaz de generar inhibición a concentraciones de campo es terbacil (herbicida selectivo), y que los herbicidas ionxinil y bromoxinil octanoato podrían generar inhibiciones leves sobre la nitrificación (Ratnayake & Audus, 1978). Por otra parte, se ha reportado que el herbicida amitrol (3-amino-1,2,4-triazol) genera una disminución de la nitrificación, con efectos similares a compuestos diseñados para la inhibición (Mahmood *et al.*, 2017).

Además, se ha observado que los insecticidas malatión y piretrina, en combinación, pueden gatillar la disminución de la nitrificación en sedimentos acuáticos, sin embargo, los autores sugieren que sus efectos no son acumulativos (Enrich-Prast, 2006).

Respecto a fungicidas, se ha señalado que maneb y direne (anilazina) pueden inhibir a bacterias amonio-oxidantes, pero no afectar a bacterias nitrito-oxidantes (Dubey & Rodriguez, 1970). También se ha reportado que ni Captan (dicarboximida de amplio espectro) ni Metalaxil (acilalanina de uso preventivo y curativo) generan efectos inhibitorios sobre la nitrificación, pero etridiazol (tiadiazol clorado anti-oomycete) generó tanta inhibición como el inhibidor de la nitrificación nitrapirin a dosis de aplicación sobre las recomendadas (Stratton *et al.*, 2002). En una revisión sistemática sobre los efectos de plaguicidas en nitrificación se señala como conclusión que los plaguicidas, aplicados a niveles de aplicación recomendados, podrían no tener efectos adversos sobre la nitrificación, sin embargo, algunas formulaciones podrían tener un efecto ralentizador, y otros podrían tener efectos estimulantes de la nitrificación en pequeñas cantidades (Sahrawat, 1974).

En cuanto a otros herbicidas, se ha reportado que glifosato no generaría diferencias en la composición de la comunidad microbiana de suelo (Kepler *et al.*, 2020). En otro estudio se señala que glifosato, glufosinato y flazasulfuron (todos herbicidas de amplio espectro) pueden generar cambios en la presencia del género fúngico *Mucor* pero se detectó un mayor recuento bacteriano en los tratamientos, sugiriendo que existe un efecto estimulador (Mandl *et al.*, 2018). También se ha reportado que 2,4-D (herbicida de amplio espectro) puede disminuir la estructura de comunidades bacterianas en rizosfera (Aguar *et al.*, 2020).

Se ha evaluado el efecto de plaguicidas sobre la microbiota del suelo: se ha sugerido que eucariontes unicelulares serían más afectados que el componente bacteriano del suelo (Bending *et al.*, 2007), otros estudios también han señalado que se producen cambios en la estructura comunitaria bacteriana del suelo durante la degradación de fungicidas (Baćmaga *et al.*, 2018). Sin embargo, aún falta por indagar los efectos de otros tipos de plaguicidas frecuentes sobre la diversidad bacteriana edáfica, en diferentes tipos suelos, diferentes cultivares, cantidad de nutrientes o de fertilizantes, representado un desafío especial para entender la como la nitrificación puede ser afectada por la presencia de plaguicidas e incidir sobre la nutrición vegetal.

1.20 Persistencia de los plaguicidas en suelo, exposición humana y consecuencias ambientales.

Los plaguicidas al ser aplicados en suelo persisten durante un intervalo de tiempo, conocido como tiempo de *vida media residual*, existiendo factores que afectan a la persistencia, tales como factores de suelo (pH, granulometría y microorganismos presentes), factores climáticos (foto-descomposición) y factores intrínsecos del compuesto químico (solubilidad, presión de vapor y estabilidad química) (Kanazawa, 1989; Curran, 2016). Esto representa un complejo paisaje fisicoquímico en el suelo, que, junto a la diversidad de especies químicas clasificadas como plaguicidas, hacen que la evaluación de su persistencia sea un desafío.

Por otra parte, el componente microbiológico de suelo contribuye de forma fundamental a la mantención de las propiedades fisicoquímicas edáficas y es parte crucial de la degradación de plaguicidas, sin embargo, existen fenómenos de absorción de plaguicidas que puede empobrecer las propiedades del suelo, especialmente en el caso de plaguicidas iónicos (Kah & Brown, 2006).

Así, las comunidades bacterianas son fundamentales para mantener la salud del suelo y se ha sugerido que estos son el componente estructural del suelo más afectado durante la aplicación de plaguicidas (Prashar & Shah 2016). Otra consecuencia ambiental de la aplicación de plaguicidas, es el desarrollo de resistencias, lo cual deriva muchas veces (de forma errónea) a una mayor cantidad de plaguicida aplicado y no a un cambio en la formulación, generando efectos perjudiciales sobre organismos no-diana (Kaur & Garg, 2014).

La persistencia de plaguicidas en el suelo comenzó a ser investigada durante los años 60, y posteriormente se incrementaron las evidencias de su movilidad en la cadena trófica, siendo observados, por ejemplo, cambios en la dureza de huevos de aves asociados a concentraciones elevadas de plaguicidas (Ratcliffe, 1970) y cambios en la dureza de huevos de tortuga terrestres (Solla & Martin, 2011). Además, existe una creciente evidencia que los plaguicidas pueden afectar no solo medioambiente, sino que también la salud humana (Özkara *et al.*, 2016). Se ha sugerido que la exposición a compuestos químicos sintéticos vinculados a plaguicidas y otros agentes contaminantes generaría daños en el desarrollo intelectual, afectando funciones endocrinas y la fertilidad en seres humanos (Brucker-Davis, 2009).

Los efectos de plaguicidas pueden variar en la salud humana dependiendo de su naturaleza química, persistencia, así como del tiempo de exposición, generando efectos a corto plazo (intoxicaciones agudas) y a largo plazo (generando, por ejemplo, cáncer, diabetes y asma, entre otras complicaciones) (Kim *et al.*, 2017). Además, los plaguicidas pueden competir por sitios diana hormonales, generando cascadas de señales inflamatorias y especies reactivas de oxígeno, lo que gatilla un estrés oxidativo en el interior de las células, desencadenando disfunciones mitocondriales, agregados proteicos, o dañar el ADN, generando mayores probabilidades de contraer cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Sabarwal *et al.*, 2018). Pese a que el cuerpo de evidencias sobre los efectos de los plaguicidas se hace cada vez más claro, y que ha habido esfuerzos por controlar el riesgo de exposición humana, aún existen discrepancias entre los valores de referencia estándar de plaguicidas en suelos y niveles de concentración máximos legales establecidos por diferentes entidades gubernamentales (Li & Jennings, 2017), y aún no está claro como estimar el impacto de plaguicidas tanto en la salud humana como en ecosistemas (Margni *et al.*, 2002), por lo que es prioritario revisar y homologar los valores de referencia y generar directrices de monitoreo toxicológico.



1.21 Fungicida Carbendazim.

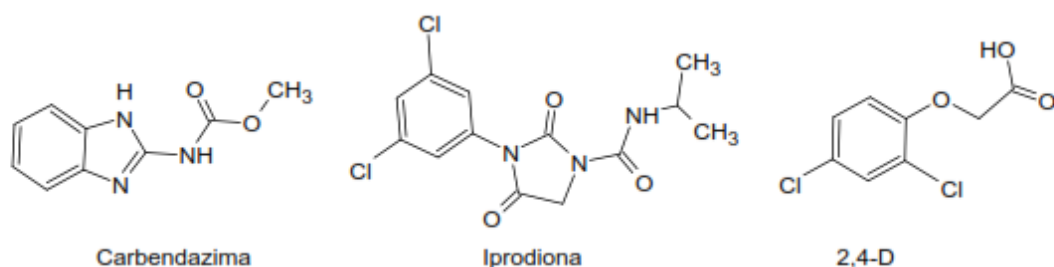


Figura 2. Estructura química de los fungicidas Iprodiona, Carbendazim y el herbicida 2,4-D.

Carbendazim (o Carbendazima), nombre IUPAC metil *N*-(1*H*-benzimidazol-2-il)-carbamato) es uno de los fungicidas de mayor empleo en agricultura a nivel mundial; es empleado frecuentemente para combatir infecciones fúngicas en frutales y hortalizas. Debido a esto, Carbendazim también es uno de los fungicidas más frecuentemente encontrados en ríos, efluentes de aguas servidas, aguas residuales industriales de textiles y papel; es un frecuente aditivo antifúngico en pinturas para hogares y revestimientos: su hallazgo en cuerpos de aguas continentales está asociado a zonas agrícolas y a zonas urbanas residenciales (Merel *et al.*, 2018). Además, Carbendazim es considerado uno de los fungicidas traza más detectados en comida, suelo y agua (Singh *et al.*, 2016).

Ya se han detectado resistencias fúngicas (*Sclerotinia sclerotiorum*), y se ha sugerido usar Carbendazim en combinación con Dietofencarb (Zhu *et al.*, 2016), por otra parte, también se ha señalado que el uso combinado de Tebuconazole (fungicida triazol de acción sistémica) y Carbendazim podrían generar una disminución de la respiración celular microbiana en suelos (Wang *et al.*, 2016a). Respecto a su aplicación y en el contexto de interacciones químicas en suelo agrícola, se ha observado que puede haber interacciones de carbendazim con el ion cobre (Da Silva Santos *et al.*, 2020). Además, se ha sugerido que los iones Cu²⁺ incrementarían la tasa de degradación de Carbendazim, proponiendo que el tiempo de efectividad sería más reducido (Singh *et al.*, 2019). Por otra parte, se ha apuntado que el uso de polímeros superabsorbentes puede aumentar la movilidad de Carbendazim (Yang *et al.*, 2018).

1.22 Fungicida Iprodiona.

Iprodiona (o Iprodione) (nombre IUPAC 3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioximidazolidina-carboxamida) es una dicarboximida utilizada ampliamente como fungicida para el control de hongos patógenos, su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de ADN e interrumpir la cadena transportadora de electrones en NADH citocromo c reductasa (Budimir *et al.*, 1976; Pappas & Fisher, 1979).

Pese a su efectividad, se han detectado cepas fúngicas resistentes a iprodiona (Fillinger *et al.*, 2012; Grabke *et al.*, 2014) y a carbendazim (Zhu *et al.*, 2016), por lo que ha recomendado su aplicación en combinación con otros tipos de fungicidas como mancozeb o carbendazim. En este escenario, destaca un antecedente que señala que iprodiona y carbendazim pueden competir por la absorción en el suelo, conduciendo a una mayor fuga de los componentes activos (Leistra & Matser, 2004).

Por otra parte, entre algunos riesgos ambientales asociados al uso de iprodiona, se puede mencionar, daños en el sistema digestivo de insectos beneficiosos para la agricultura (Carneiro *et al.*, 2020), efectos citotóxicos sobre meristema radicular vegetal (Fioresi *et al.*, 2020) y efectos sobre la espermatogénesis (Durand *et al.*, 2017). Respecto a efectos en la microbiota del suelo, se ha observado que iprodiona puede ejercer efectos negativos en las actividades enzimáticas del suelo y generar cambios en la estructura comunitaria bacteriana, incrementando la abundancia relativa de Proteobacteria, pero reduciendo otros *phyla* como Chloroflexi y Acidobacteria, entre otros (Zhang *et al.*, 2017).

1.23 Herbicida ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D).

2,4-D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) es un herbicida auxínico y ha sido usado ampliamente desde 1945, sin embargo, pese a los beneficios otorgados sobre la producción mundial de vegetales, se ha detectado un incremento en la resistencia a 2,4-D en algunas plantas no deseadas en cultivo, tales como el rábano silvestre (*Raphanus raphanistrum*) (Schulz & Segobye, 2016). Por otra parte, también se ha sugerido que 2,4-D puede ser perjudicial para el crecimiento de los cultivos, por lo que su uso ha disminuido durante los últimos 30 años (Peterson *et al.*, 2016).

Sus efectos sobre la nitrificación han sido estudiados esporádicamente: algunos antecedentes señalan que tanto 2,4-D-amina y 2,4-D-ester pueden ejercer efectos inhibitorios sobre la nitrificación de urea, pero existen grandes variaciones dependiendo del tipo de suelo y el tiempo de exposición (Martens & Bremner, 1993), por otra parte, en un estudio de efectos a largo plazo, se aplicó 2,4-D sobre suelos agrícolas con cultivares, durante 15 años, se observó que 2,4-D-ester puede ejercer más inhibición de la nitrificación que 2,4-D-amina (Rai, 1992). Respecto a riesgos ambientales, se ha reportado que 2,4-D puede generar efectos tóxicos en epitelios de pez, vinculándose a una mayor probabilidad de infección (Vigário & Sabóia-Morais, 2014)

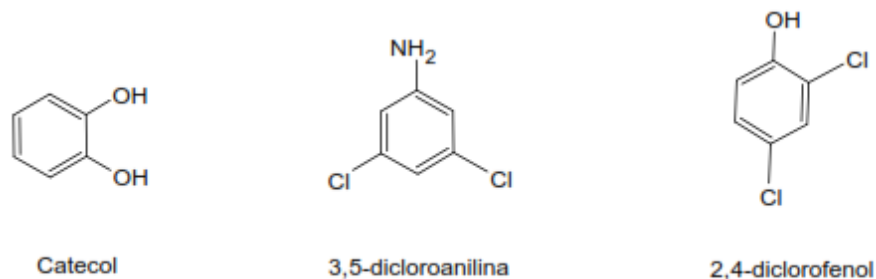


Figura 3. Estructura química de catecol, 3,5-dicloroanilina y 2,4-diclorofenol.

1.24 Biodegradación de plaguicidas en suelos y efectos de productos de biodegradación de plaguicidas sobre los microorganismos.

Los plaguicidas pueden ser sometidos a distintas transformaciones abióticas o bióticas en el suelo, conduciendo a transformaciones químicas (por ejemplo, reacciones de óxido-reducción), transformaciones físicas (fotodegradación) o transformaciones bióticas, donde cabe destacar fenómenos de co-metabolismo o mineralización (Ortiz-Hernández *et al.*, 2013).

Particularmente, la biodegradación puede ser definida como “aquel proceso de reducción biológicamente catalizada de compuestos químicos” (Tahri *et al.*, 2013). Una de las características deseables de los plaguicidas durante su aplicación es que posean una vida útil corta en el suelo o en la superficie de cultivos, sin embargo, se ha sugerido que la persistencia de plaguicidas y, paradójicamente, sus productos de degradación podrían existir por más de una década en suelos agrícolas (Chiaia-Hernandez *et al.*, 2017).

Los plaguicidas antes mencionados (carbendazim e iprodiona) pueden ser sometidos a biodegradación: carbendazim pertenece a la familia de los benzimidazoles e iprodiona a la familia de las dicarboximidazoles: ambas familias químicas pueden ser degradadas en el ambiente por procesos fotoquímicos y enzimáticos (Hewitt & Oliver, 2014). Por ejemplo, se ha documentado en distintas instancias el potencial biodegradativo de algunas cepas: la cepa *Bacillus licheniformis* JTC-3 es capaz de transformar carbendazim a 2-hidroxibenzimidazole (Panda *et al.*, 2018), mientras una cepa de *Rhodococcus erythropolis* puede degradar carbendazim tanto a 2-aminobenzimidazole como 2-hidroxibenzimidazole (Zhang *et al.*, 2013), y se ha documentado que cepas de *Enterobacter* y *Bacillus* tendrían también potencial biodegradativo (Cycoñ *et al.*, 2011).

Carbendazim puede ser degradado por acción de la radiación ultravioleta (Mazellier *et al.*, 2002), (de forma similar a lo que ocurre con Benomyl), y puede ser degradado también a 2-aminobenzimidazole o 2-hidroxibenzimidazole por *Rhodococcus jianlingiae* (Wang *et al.*, 2010). Por otra parte, *Arthrobacter* y *Achromobacter* en un consorcio fueron capaces de degradar Iprodiona a 3,5-dicloroanilina (3,5-DCA) (Campos *et al.*, 2017), similarmente se ha observado que Iprodiona puede ser degradado por *Arthrobacter* (Athiel *et al.*, 1995), *Paenarthrobacter* (Yang *et al.*, 2018), y otros organismos (Mercadier *et al.*, 1997).

1.25 3,5-dicloroanilina.

3,5-dicloroanilina (anilina halogenada) es considerado el principal producto de la transformación de Iprodiona (Campos *et al.*, 2017), sin embargo, se ha observado que puede generar mayores efectos adversos que su compuesto de origen, tanto sobre la nitrificación como sobre la diversidad bacteriana de suelo (Vasileiadis *et al.*, 2018). Similarmente, otras anilinas halogenadas son capaces de generar inhibición de la nitrificación en suelo (Thompson & Corke, 1969; Corke & Thompson 1970). La biodegradación de anilinas halogenadas ha sido caracterizada (Commandeur & Parsons, 1990), ya que estas han sido reconocidas como agentes dañinos para la salud humana (Ohashi *et al.*, 2005; Rankin *et al.*, 2020).

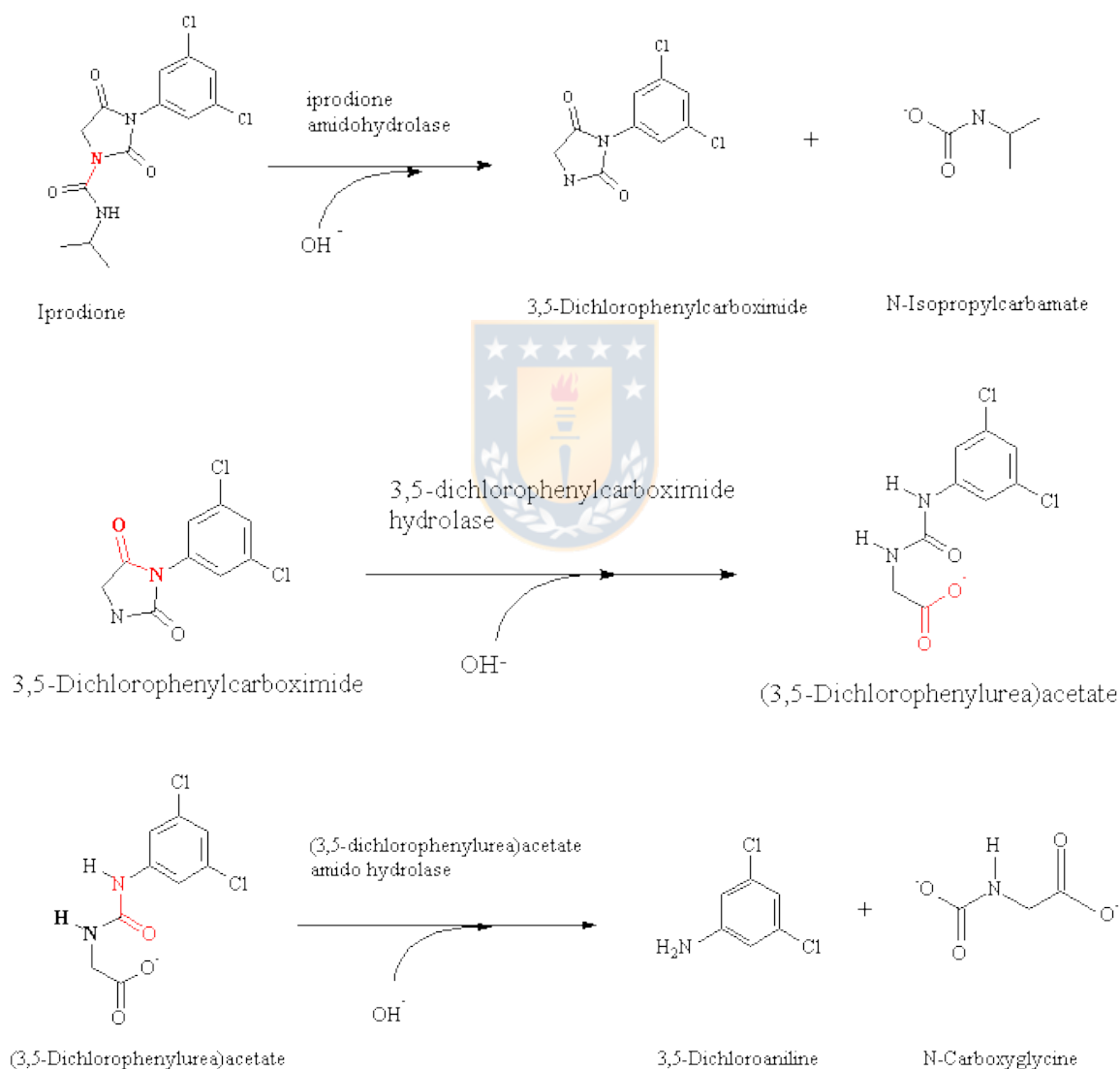


Figura 4. Esquema de reacciones de biodegradación de Iprodiona a 3,5-dicloroanilina.

Fuente: <http://eawag-bbd.ethz.ch>

1.26 Catecol.

Catecol es uno de los principales productos de transformación de Carbendazim (Fang *et al.*, 2010), junto a 2-hidroxibenzimidazole (Wang *et al.*, 2010). El catecol puede ser degradado por *Thauera aromatica* mediante fosforilación/carboxilación, y finalmente metabolizado (Ding *et al.*, 2008), sin embargo, se ha observado que catecol posee actividad antibacteriana en otros microorganismos (Kocaçalışkan *et al.*, 2006). Además, catecol es considerado un compuesto aleloquímico, que puede presentarse de forma natural en suelos, junto a otros compuestos fenólicos y ácidos húmicos. Catecol es una quinona que puede inhibir el primer paso de la nitrificación (Suarez-Ojeda *et al.*, 2010), y también puede afectar a la amonificación (Bundy & Bremner, 1974; Pagoni *et al.*, 2019), y sus derivados son inhibidores de la actividad ureasa (Mazzei *et al.*, 2017). Además, la presencia de nitritos en un ambiente determinado, puede generar un bloqueo del proceso biológico de mineralización del catecol, gatillando una conversión abiótica de catecol a una forma más recalcitrante (Zheng *et al.*, 2019). Por otra parte, existe un grupo de moléculas similares al catecol considerados como sideróforos, que poseen propiedades quelantes y que son sintetizadas por microorganismos para facilitar la adquisición de hierro (Barnes & Ishimaru, 1999).

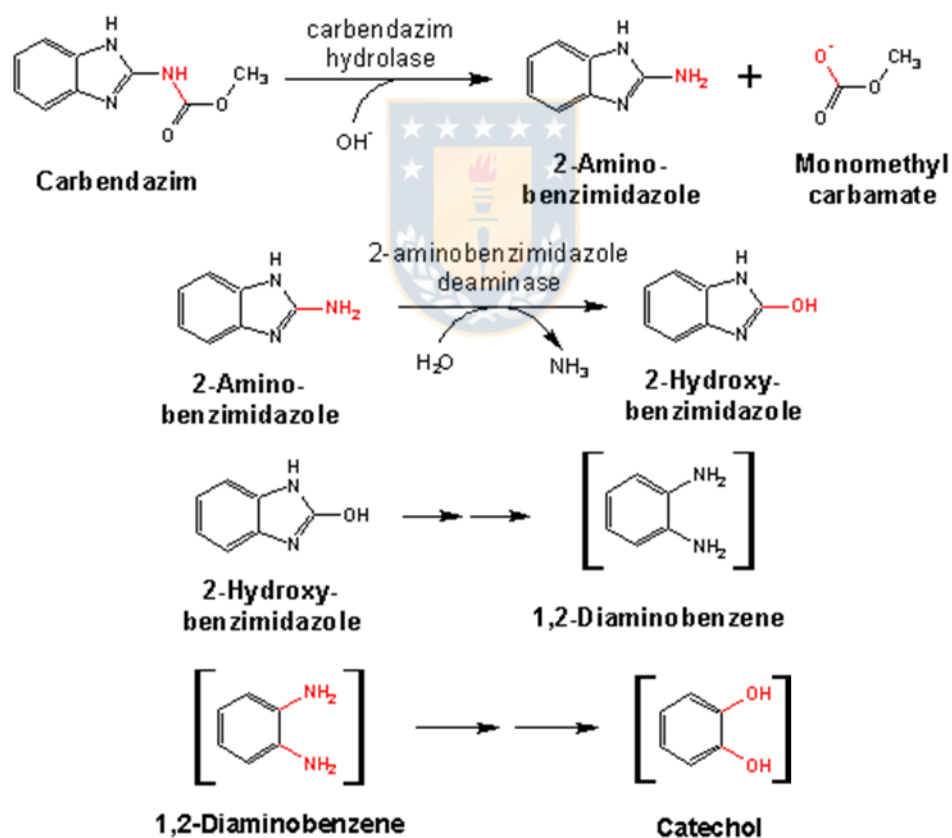


Figura 5. Esquema de reacciones de biodegradación de carbendazim a catecol.

Fuente: <http://eawag-bbd.ethz.ch>

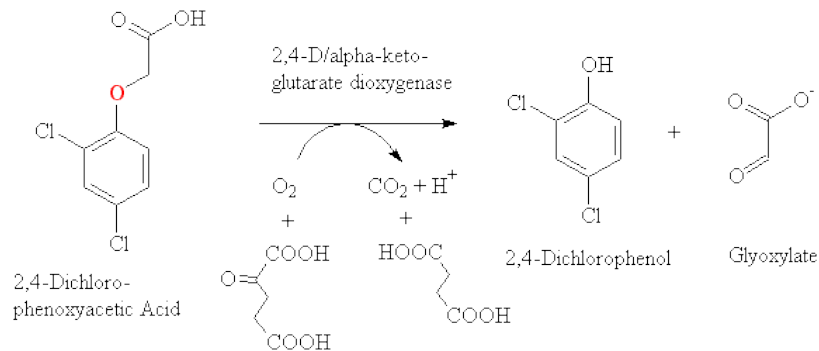


Figura 6. Esquema de reacciones de biodegradación de 2,4-D a 2,4-dichlorophenol.
Fuente: <http://eawag-bbd.ethz.ch>

1.27 2,4-diclorofenol.

Respecto a los orígenes de la presencia de 2,4-diclorofenol en suelos, esta se genera como principal producto de biodegradación del herbicida 2,4-D, cuya transformación es mediada por la enzima 2,4-diclorofenoxiacetato/alfa-cetoglutarato dioxigenasa (Fukumori & Hausinger, 1993; Poh *et al.*, 2001). Además, otra fuente de 2,4-diclorofenol puede ser la biodegradación de triclosán (Kumari & Sachan, 2019). Sin embargo, la degradación de 2,4-diclorofenol puede ser poco eficiente por que el proceso carece de donación de electrones (Zhang *et al.*, 2018), esto supone un problema porque durante el proceso de biodegradación se necesita de otras fuentes de energía para poder metabolizarlo. No obstante, hay organismos que son capaces de utilizar al 2,4-diclorofenol tanto como fuente de carbono o como fuente de energía (Quan *et al.*, 2004).

Respecto al proceso de nitrificación, 2,4-diclorofenol puede afectar a *Nitrobacter* (Wang & Reed, 1983), y se ha observado que 2,4-diclorofenol puede afectar de manera reversible la nitrificación en un sistema de remoción biológica de nitrógeno (Lim *et al.*, 2012), similarmente, 2,4-triclorofenol puede afectar reversiblemente la desnitrificación y nitrificación, y alterar la estructura comunitaria bacteriana (Tong *et al.*, 2019). Además de esto, los clorofenoles al afectar al proceso de desnitrificación, pueden generar cambios en el proceso de reducción del nitrato (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2017). Finalmente, integrando el problema que genera la presencia de cobre en el suelo, uno de los pocos antecedentes que existe al respecto sugiere que la presencia de 2,4-diclorofenol puede afectar la solubilidad del cobre, indicando que podría aumentar su biodisponibilidad (Chen *et al.*, 2004).

Planteamiento del problema.

La agricultura está siendo transformada por la incorporación de nanopartículas en la producción de vegetales, sin embargo, sus efectos ambientales no están claros aún. Además, se espera que el uso de plaguicidas sea sostenido durante el siglo XXI.

De esta manera se plantea que, en el suelo, pueden ocurrir escenarios de coexistencia entre nanopartículas de cobre, plaguicidas y derivados biodegradativos que pueden afectar la nitrificación.

Nitrobacter winogradskyi posee antecedentes de sensibilidad a estos compuestos, sin embargo, existe la interrogante sobre cómo estos escenarios de coexistencia afectarían su actividad. Por lo que es necesario estudiar tanto, los efectos de la co-contaminación de nanopartículas de cobre y plaguicidas, como de, nanopartículas de cobre y derivados de plaguicidas sobre la actividad de *N. winogradskyi*.



HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los siguientes antecedentes:

- a) *Nitrobacter* es una bacteria nitrificante que presenta alteraciones metabólicas negativas en presencia de iones metálicos o plaguicidas.
- b) Las bacterias nitrificantes son sensibles a nanopartículas metálicas, y en particular a nanopartículas de cobre.
- c) Existen efectos sinérgicos negativos por parte de nanopartículas metálicas y otros agentes sobre la actividad metabólica de algunos microorganismos y particularmente sobre organismos nitrificantes.

Se plantea la siguiente hipótesis:

La actividad metabólica de *Nitrobacter winogradskyi* es afectada negativamente por la acción sinérgica de nanopartículas metálicas y plaguicidas.



OBJETIVOS

Objetivo General.

Evaluar si la exposición simultánea a nanopartículas de cobre (CuNPs, CuONPs) y plaguicidas (iprodiona, carbendazim) afecta la actividad metabólica y el patrón de expresión de proteínas de *Nitrobacter winogradskyi*.

Objetivos Específicos.

- Determinar si la actividad metabólica de *Nitrobacter winogradskyi* es afectada negativa y sinérgicamente por la exposición simultánea de CuNPs y plaguicidas.
- Establecer, si en *Nitrobacter winogradskyi* se modifica el patrón de expresión de proteínas debido a la exposición simultánea a CuNPs y plaguicidas.



METODOLOGÍA

4.1 Compuestos químicos utilizados.

Se utilizó nanopartículas de cobre metálico (40 – 60 nm, Sigma-Aldrich™) y nanopartículas de óxido de cobre (Copper Oxide Nanopowder – 40 nm, SkySpring Nanomaterials, Inc. 2935 Westhollow Dr., Houston, TX 77082, USA). Como control se utilizó cobre en forma iónica, mediante el uso de Sulfato de Cobre (II) heptahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 102790 - Merck™).

Los plaguicidas utilizados fueron los fungicidas Iprodiona (99% pureza, 36132 - Sigma-Aldrich™, y Carbendazim (99% pureza, 378674 - Merck™), y el herbicida 2,4-D (820451) Sigma-Aldrich™. Derivados de plaguicidas: 3,5-dicloroanilina (841790 - Sigma-Aldrich™), Catecol (135011- Sigma-Aldrich™), y 2,4-diclorofenol (803774 – Sigma-Aldrich™).

Las nanopartículas metálicas de cobre (CuNPs) fueron caracterizadas previamente en CIBAMA, Temuco (Parra *et al.*, 2019), y nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) según especificaciones del proveedor (SkySpring Nanomaterials, Inc.).

4.2 Cepas bacterianas, condiciones de cultivo, y monitoreo de crecimiento bacteriano.

La cepa bacteriana *Nitrobacter winogradskyi* ATCC 25391 fue cultivada a una concentración inicial de 1×10^6 bacterias/mL durante 30 días en medio autotrófico para *Nitrobacter* (ANW Media – DMSZ Medium 756c), donde cada litro contiene 2 g NaNO_2 , 100 mL de solución stock (conteniendo por litro: 5 g NaCl, 1.5 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.07 g CaCO_3), y 1 mL de solución traza (conteniendo por litro 97.3 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 49.4 mg de H_3BO_3 , 43.1 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37.1 mg de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 33.8 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25.0 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ajustado a pH 7.5. El cultivo fue realizado a agitación constante de 130 rpm, 30°C de temperatura, en ausencia de luz y con un volumen final de 100 mL.

Para mantención del cultivo, se generó una solución madre con un volumen final de 2 litros, desde donde se transfirieron alícuotas hacia matraces de 250 mL, para realizar los ensayos. Cada 20 días se realizó el cambio de la solución madre (ya que el nitrito es consumido y transformado a nitrato), mediante filtración y concentración de bacterias usando membranas (diámetro de poro \varnothing : 0,22 μm). La concentración inicial de cultivo en los matraces sometidos a tratamientos fue de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL, siendo mantenidos durante 30 días.

Para monitorear el crecimiento del cultivo, se realizó una regresión lineal para conocer la relación entre densidad óptica y densidad bacteriana del cultivo: *N. winogradskyi* posee una baja densidad óptica a 600 nm ($A_{\lambda=600\text{nm}} = 0.030\text{-}0.050$). Se extrajo una alícuota de 1 mL de *N. winogradskyi* cada 2 días para medir densidad óptica a 600 nm (OD_{600}), usándose un espectrofotómetro UV-Vis Spectra (Bausch & Lomb, Model Tu-1810 Split Beam). Además, se extrajo 1 mL de cultivo *N. winogradskyi*, al cual se le agregaron 2 gotas de naranja de acridina, para ser luego filtrado usando membranas PCTE (black-dyed) (diámetro de poro \varnothing : 0,22 μm), para contabilizar bacterias mediante microscopía de epifluorescencia.

La concentración bacteriana fue calculada usando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración}(\text{Células} * \text{mL}^{-1}) = \left(\frac{(\bar{X}_c)V_m A_f}{A_c} \right)$$

Donde X_c es la media del conteo de células por campo (100x), A_f es el área del filtro (210 mm²), A_c es el área visualizada (0.0045 mm²) y V_m es el volumen de la muestra. Luego se realizó una regresión lineal para predecir la concentración bacteriana de otros experimentos. (Hobbie *et al.*, 1977).

4.3 Control de presencia de bacterias heterotróficas.

Para verificar la posible presencia de bacterias contaminantes heterotróficas, cada 10 días se obtuvieron alícuotas de 100 µL desde los cultivos las que fueron diseminadas en superficie de placas con agar R2A y placas con agar Miller-Hinton, e incubadas durante 5 días a 30°C. Si se constataba la presencia de colonias sugería presencia de bacteria heterotróficas, descartándose el cultivo. *N. winogradskyi* solo crece en agar mixotrófico (noble) luego de varias semanas de incubación en cámara húmeda a 28°C, y es susceptible a cambios de luz y ventilación (Spieck & Lipski, 2011).

4.4 Medición de nitritos.

Para medición de nitrificación en los ensayos de microplaca, alícuotas de 100 µL fueron obtenidas desde los ensayos y agregadas a 100 µL del reactivo de Griess (5 g de ácido sulfanílico + 1.5 g N-(1-Naftil)-Etilendiamina) disueltos en 1 L de ácido acético 30% v/v), y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Se realizó una curva de calibrado con soluciones decrecientes de nitritos (30 – 3x10⁻⁷ µg/mL NaNO₂), y se midió absorbancia a 540 nm, luego se hizo una regresión lineal usando el rango de concentración. La medición de actividad nitrificante de los cultivos en matraces se realizó usando 1 mL del cultivo, centrifugada a 9000 g, descartando el pellet, usando el sobrenadante, el cual fue diluido 10 veces con agua destilada. A 500 µL de muestra se le agregó 500 µL de reactivo de Griess. La muestra se dejó incubar a temperatura ambiente por un tiempo de 40 minutos y posteriormente se midió absorbancia a 540 nm. La disminución de la presencia de nitritos fue considerada positiva para la actividad nitrificante.

4.5 Ensayos de actividad metabólica.

En microplacas de 96 pocillos de fondo plano (Tissue culture plate, 96 wells Ultra Cruz, con un volumen total de 250 µL por pocillo), fueron agregadas alícuotas de 115 µL de cultivos de *N. winogradskyi* con una densidad celular de 1x10⁷ bacterias*mL⁻¹ resuspendidas en Medio nitrificante sin nitrito 1x (cultivadas previamente durante 24 días a 30°C y 130 rpm), Luego se agregaron 100 µL de solución de nitrito de sodio (2.6 g/L NaNO₂) y 25 µL de PBS 1x con una cantidad apropiada de cada compuesto ensayado. Se realizó una medición de absorbancia a tiempo cero, sin WST-1 para generar línea base a 480 nm (BioTek™ Epoch™ Microplate Spectrophotometer).

Los pocillos de microplacas fueron incubados a 30°C, en cámara húmeda y agitadas durante 1 hora por día en *shaker table* (200 rpm) para evitar hipoxia. Para las mediciones de los primeros días (0, 1, 2 días), se agregó WST-1 al inicio del experimento (10 µL de WST-1) y se dejó incubar hasta el día 2. Las mediciones del día 8 y día 24, fueron realizadas como experimentos independientes, agregándose el WST-1 en dichos días dejándose incubar por 12 horas (Johnsen *et al.*, 2002).

La lectura de absorbancia alcanzada a 480 nm y restando el fondo (600 nm), tomando en consideración que la Sal de Tetrazolio (WST-1) será reducida a Formazán (A_{max} rango $\lambda = 420 - 480$ nm). Los valores fueron normalizados a partir de las lecturas obtenidas del control para cada día, expresándose como porcentaje de actividad respecto al control (tratadas/no-tratadas*100).

4.6 Tratamientos combinados.

Los tratamientos combinados de plaguicidas y nanopartículas siguen el siguiente diseño (Figura 7): combinación entre nanopartículas (CuNPs, CuONPs y CuSO₄) y plaguicidas (Carbendazim, Iprodione, 2,4-D), y combinación entre CuNPs y compuestos derivados de plaguicidas (3,5-dicloroanilina, catecol, 2,4-diclorofenol).

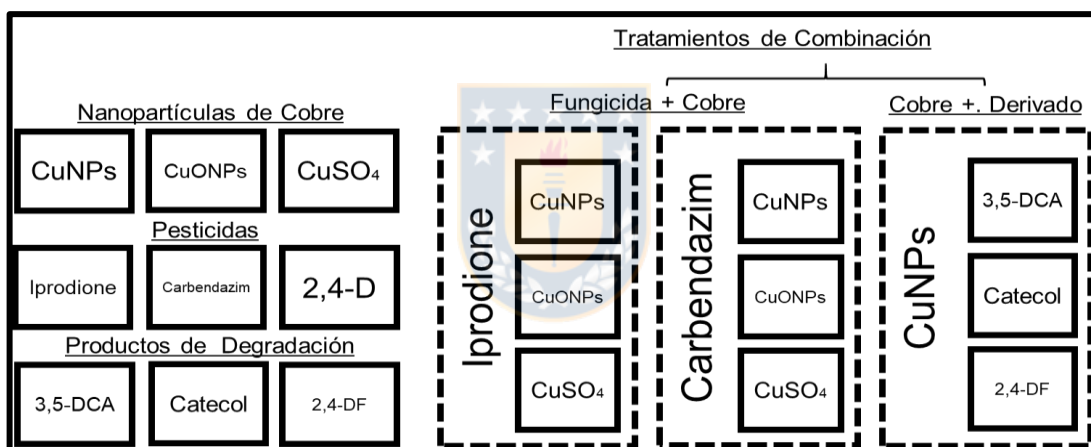


Figura 7. Esquema de diseño experimental de tratamientos.

Para hacer referencia a los distintos tipos de combinaciones se hará referencia a la siguiente nomenclatura: marginales (tratamientos sin combinación), combinaciones balanceadas (tratamientos con dos compuestos a igual concentración) y combinaciones no-balanceadas (tratamientos con dos compuestos a distinta concentración).

Se ensayaron 4 niveles de concentración diferentes (0.04 mM, 0.16 mM, 0.64 mM y 2.56 mM) para cada compuesto y sus combinaciones. Las concentraciones fueron elegidas basándose en las siguientes publicaciones: Kent & Vikesland (2016), De Peretti *et al.*, (1987), Lang & Cai (2009), Briceño *et al.*, (2020). Las concentraciones de nanopartículas fueron calculadas como equivalentes milimolar de CuSO₄, y sus concentraciones son informadas en mg L⁻¹.

4.7 Análisis estadísticos y Software.

Para evaluar diferencias significativas entre el control y los distintos niveles de los tratamientos, se utilizó la prueba t de *Student* de dos colas, llevado a cabo en programa Prism GraphPad®.

4.8 Evaluación del sinergismo.

Los análisis estadísticos de evaluación de sinergismo fueron realizados en R versión 4.0.1: se evaluó la normalidad de datos realizando test de Shapiro-Wilk y de Levene. Para evaluar diferencias significativas entre compuestos para cada combinación binaria se utilizó el test de Scheirer-Ray-Hare (SRH) (Scheirer *et al.*, 1976).

Tabla 3. Listado de librerías en R utilizadas para los análisis estadísticos y modelos en la presente tesis.

Librería	Uso	Referencias
<i>BIGL</i>	Modelo generalizado de Loewe/HSA	Van Der Borght <i>et al.</i> , 2017; Turner <i>et al.</i> , 2020
<i>Braidrm</i>	Modelos de ajuste de dosis/respuesta	Twarog <i>et al.</i> , 2016; Twarog 2016
<i>Broom</i>	Conversiones de tablas	Robinson <i>et al.</i> , 2020
<i>cluster</i>	Análisis de clúster	Maechler <i>et al.</i> , 2021
<i>DescTools</i>	Estadística Descriptiva	Andri <i>et al.</i> , 2021
<i>dplyr</i>	Filtrado y selección	Wickham <i>et al.</i> , 2020
<i>gdata</i>	Administración de datos	Warnes <i>et al.</i> , 2017
<i>genridge</i>	Regresiones	Friendly, 2020
<i>ggplot2</i>	Representaciones Gráficas	Wickham, 2016
<i>grid</i>	<i>Multiplot</i>	R Core Team, 2020
<i>gridExtra</i>	Agrupación de gráficos	Auguie, 2017
<i>pheatmap</i>	Gráfico tipo <i>heatmap</i>	Kolde, 2019
<i>knitr</i>	Generación de reportes	Xie, 2014; 2015
<i>MASS</i>	Estadística Aplicada	Venables & Ripley, 2002
<i>OrgMassSpecR</i>	Análisis de datos en espectrometría de masas	Dodder, 2017
<i>Peptides</i>	Cálculo de propiedades fisicoquímicas teóricas de proteínas	Osorio <i>et al.</i> , 2015
<i>plyr</i>	División de estructuras de datos	Wickham, 2011
<i>purrr</i>	Programación Funcional	Henry & Wickham, 2020
<i>rcompanion</i>	Test SRH	Mangiafico, 2020
<i>rgl</i>	gráficos OpenGL	Adler <i>et al.</i> , 2020
<i>scales</i>	Mejora estética de gráficos	Wickham & Seidel, 2020
<i>stargazer</i>	Formato de presentación de tablas	Hlavac, 2018
<i>stringr</i>	Facilitación de obj. tipo hebra	Wickham, 2019
<i>tibble</i>	<i>Data Frames</i>	Müller & Wickham, 2020 Wickham & Henry, 2020
<i>tidyr</i>	Correcciones HTML y <i>Markdown</i>	Wickham <i>et al.</i> , 2019
<i>tidyverse</i>	Representación de datos, migración	Wickham <i>et al.</i> , 2019
<i>vegan</i>	PCoA - PERMANOVA	Oksanen <i>et al.</i> , 2017

Para predecir las combinaciones binarias desequilibradas se realizó una regresión no-lineal con distribución binomial negativa (librería *MASS*). Se generó una predicción y se agregaron estos datos para reforzar los modelos posteriores.

Para discriminar entre efectos sinérgicos o aditivos generados por las distintas combinaciones de compuestos químicos se realizaron análisis de sinergismo con tres modelos diferentes: aditividad de Loewe, HSA (librería *BIGL*) (Van der Borgh *et al.*, 2017). Los resultados de estos análisis fueron representados en tablas, isoblogramas y resúmenes de aditividad.

4.9 Definición de Modelo de Loewe.

El modelo experimental, para cada ensayo de combinación, puede ser descrito como un espacio matricial de 5 x 5, donde la concentración de compuestos se representa como:

$$M_{\omega} = \begin{pmatrix} a_4 \cdot b_0 & \mu_4 \cdot \lambda_1 & \mu_4 \cdot \lambda_2 & \mu_4 \cdot \lambda_3 & a_4 \cdot b_4 \\ a_3 \cdot b_0 & \mu_3 \cdot \lambda_1 & \mu_3 \cdot \lambda_2 & a_3 \cdot b_3 & \mu_3 \cdot \lambda_4 \\ a_2 \cdot b_0 & \mu_2 \cdot \lambda_1 & a_2 \cdot b_2 & \mu_2 \cdot \lambda_3 & \mu_2 \cdot \lambda_4 \\ a_1 \cdot b_0 & a_1 \cdot b_1 & \mu_1 \cdot \lambda_2 & \mu_1 \cdot \lambda_3 & \mu_1 \cdot \lambda_4 \\ a_0 \cdot b_0 & a_0 \cdot b_1 & a_0 \cdot b_2 & a_0 \cdot b_3 & a_0 \cdot b_4 \end{pmatrix}$$

Donde en la matriz de combinaciones existen tres grupos: control (a_0b_0), tratamientos sin combinación (marginales) (a_nb_0 , a_0b_m) y combinaciones binarias balanceadas (a_nb_m , con $n = m$). Las predicciones provenientes desde la regresión binomial negativa fueron incluidas para generar combinaciones desbalanceadas ($\mu_n \lambda_m$, $n \neq m$), necesarias para construir los modelos.

Sea d_1 y d_2 las dosis de los compuestos 1 y 2, que generan un efecto biológico e_1 y e_2 . Cada dosis necesaria para generar el efecto será denominada como D_{e1} y D_{e2} . Luego, la relación entre estas dosis puede representarse como:

$$\frac{D_{e1}}{D_{e2}} = P_{(D_{e1}/D_{e2})}$$

Donde P es la potencia (que tan intenso es el efecto en comparación al control) de la dosis del compuesto 1 en comparación al compuesto 2. También podemos considerar que la misma dosis (a un mismo nivel de concentración) puede generar un efecto diferente:

$$\frac{d_2 D_{e1}}{D_{e2}}$$

Luego, esta nueva relación se interpreta como la potencia de la dosis del compuesto 2 sobre el compuesto 1 está a la misma concentración. Esta relación entonces informa sobre qué tan grande puede ser la diferencia entre los efectos.

Luego, la aditividad de Loewe es definida como:

$$d_1 + \frac{d_2 D_{e1}}{D_{e2}} = D_{e1}$$

Luego,

$$\frac{d_1}{D_{e1}} + \frac{d_2}{D_{e2}} = 1$$

Así, la aditividad de Loewe es un evento donde las isobolas (líneas de equivalencia de efecto en el espacio de combinación de compuestos) serán segmentos que van desde $(D_{e1}, 0)$ a $(0, D_{e2})$ en un dominio (d_1, d_2) .

Luego, las imágenes de las funciones (representadas como efectos de las dosis) de los tratamientos donde la concentración de uno de los compuestos $(f_1(d_1), f_2(d_2))$ es cero y los efectos de las combinaciones binarias balanceadas $(f_{12}(d_1, d_2))$ en una mezcla pueden ser representados en una sola función.

Entonces, se representa a los efectos generados por las dosis (D_{e1}, D_{e2}) como:

$$\frac{d_1}{D_{e1}} + \frac{d_2}{D_{e2}} \equiv \frac{d_1}{f_1^{-1}(f_{12}(d_1, d_2))} + \frac{d_2}{f_1^{-1}(f_{12}(d_1, d_2))} = 1$$

Siendo estas funciones continuas e inversamente proporcionales a cada dosis de cada compuesto (Lederer *et al.*, 2018; Loewe, 1928).

4.10 Definición de Modelo HSA.

Highest Single Agent (HSA), también denominado como *Gaddum's non-interaction reference*, es el otro modelo utilizado. HSA es una superposición de curvas de agentes aislados, donde a cualquier concentración, x, y , el modelo de inhibición HSA será:

$$HSA_i = \max(X_i, Y_i)$$

Donde X_i e Y_i son los efectos producidos por los agentes aislados a las concentraciones $(x, 0)$, y $(0, y)$, respectivamente. Los valores del modelo son calculados en cada punto de la matriz de dosis, donde X_i e Y_i son determinados usando ajustes sigmoïdales en los datos de respuesta de cada agente aislado (Tang *et al.*, 2015; Berenbaum, 1989).

4.11 Estimación de IC₅₀.

A partir de los resultados obtenidos desde día 8 de incubación se realizó una regresión polinomial utilizando el software R (versión 4.0.1 – IDE RStudio). (Las fórmulas obtenidas desde la regresión están en la sección Anexos). Una vez obtenidas las fórmulas se reemplazó el valor de $y = 0.5$ (50% de actividad). Los valores obtenidos mediante esta estimación fueron utilizados como referencia para los ensayos de exposición para experimentos posteriores. Las concentraciones estimadas fueron informadas en función del intervalo ≤ 0.04 mM y ≥ 2.56 mM.

4.12 Cambios en perfil proteico mediante MALDI-TOF/TOF MS.

Una concentración de $100x$ (1×10^8 bacterias mL^{-1}) de *N. winogradskyi* fue alcanzada a partir de la centrifugación de 2 litros de suspensión bacteriana (a 10 días de cultivo) en un volumen final de 2 mL. Posteriormente esto fue resuspendido en buffer fosfato de potasio (1x).

Se realizó una transferencia de los 2 mL a 7 tubos de ensayo pequeños (volumen final 1 mL cada uno (285 μ L de suspensión + 715 μ L de medio nitrificante 1x + concentración de compuesto alcanzada a la IC₅₀). Los ensayos tuvieron un tiempo de exposición de 24 horas.

Luego las muestras fueron lavadas con agua de grado biología molecular. Posteriormente centrifugadas a 8000 g por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células bacterianas fueron resuspendidas en 20 μ L de ácido fórmico. Se agitó por *vortex*, posteriormente se agregaron 20 μ L de acetonitrilo seguido de una centrifugación a 8000 g por 2 minutos.

Una alícuota de 1 μ L de sobrenadante fue puesto en una placa MALDI, secado a temperatura ambiente, luego se agregó 1 μ L de solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (diluido en 50% acetonitrilo con 2.5% TFA). El espectro de masas fue obtenido usando el instrumento MALDI-TOF TOF MS Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), equipado con una fuente de laser *smart beam* (334 nm). Los análisis fueron llevados a cabo en modo linear con polaridad positiva, con una aceleración de voltaje 20 kV y un retraso de extracción de 220 ns. Cada espectro fue colectado como una media de 1200 lanzamientos de rayos láser con suficiente energía para producir un buen espectro sin saturación en el rango de 2000 a 20000 m/z. Antes de los análisis, el instrumento fue calibrado externamente con un patrón de calibrado de proteína I (Protein Calibration Pattern I - Bruker Daltonics, Bremen, Germany - insulina, ubiquitina, citocromo C y mioglobina).

4.13 Detección estadística de cambios en perfil proteico mediante MALDI-TOF/TOF MS.

Para evaluar diferencias entre perfiles obtenidos, se realizó un Análisis Multivariado de Varianza no-paramétrico (PERMANOVA), para evaluar las principales señales detectadas (>500 m/z), se utilizaron 4 parámetros (masa/carga, intensidad de señal, factor de calidad y proporción de señal/ruido) para 7 tratamientos (Carbendazim, Carbendazim + CuNPs, Control, Iprodiona, Iprodiona + CuNPs, CuNPs y CuONPs).

Los datos fueron agrupados en un *dataframe*, y procesados para generar una matriz de distancias (binomial y euclidiana) entre los diferentes tratamientos. Posteriormente se realizó un test estadístico para establecer diferencias significativas entre varianzas para cada tratamiento: se realizó un ANOVA multivariado con 999 permutaciones para estadístico F. Para establecer diferencias significativas entre tratamientos se realizó un test de Tukey *post-hoc*, y se graficaron los grupos y sus distancias hasta centroides (obtenidos desde dos ejes de PCoA generados) (Anderson, 2017).

A partir de la lista de principales masas/cargas obtenidas, se extrajeron los principales valores y estos fueron comparados con la base de datos de UniProtKB/Swiss-Prot, usando la herramienta *TagIdent tool* (<https://www.web.expasy.org/tagident/>) y el software R 4.0.1 (IDE RStudio). El criterio de búsqueda en la base de datos fue: "*protein molecular weight: 1000 - 10000 Da, taxonomy: Nitrobacter sp*" (Božik *et al.*, 2018). Luego se generaron listados de proteínas candidatas detectadas en cada tratamiento, para luego generarse una matriz de comparación representadas gráficamente en un *heatmap*. Más detalles del código utilizado para los análisis estadísticos están disponibles en el Anexo "Scripts empleados".

RESULTADOS

5.1 Tratamientos con nanopartículas de cobre metálico (CuNPs), óxido de cobre (CuONPs) y sulfato de cobre (CuSO₄).

Los efectos de las nanopartículas de cobre sobre la actividad metabólica de *N. winogradskyi* muestran diferencias respecto al tipo de compuesto y concentración. En la figura 8, CuNPs reduce la actividad metabólica a concentración de 2.5 mg L⁻¹, indicando un decrecimiento del 28.46% respecto al control.

A mayores concentraciones de CuNPs y CuSO₄, la actividad metabólica decrece aún más (10.2 mg L⁻¹ CuNPs, -84.33%; 0.16 mM CuSO₄, -96.87%). Sin embargo, una concentración de 3.2 mg L⁻¹ de CuONPs, la actividad metabólica no mostró diferencias significativas respecto al control (valor p=0.0922, -39.76% de actividad respecto al control). Pero, a una concentración de 12.7 mg L⁻¹ de CuONPs la actividad metabólica se redujo un 82.42%, mientras que a 203.6 mg L⁻¹, se redujo un 74.93% respecto al control.

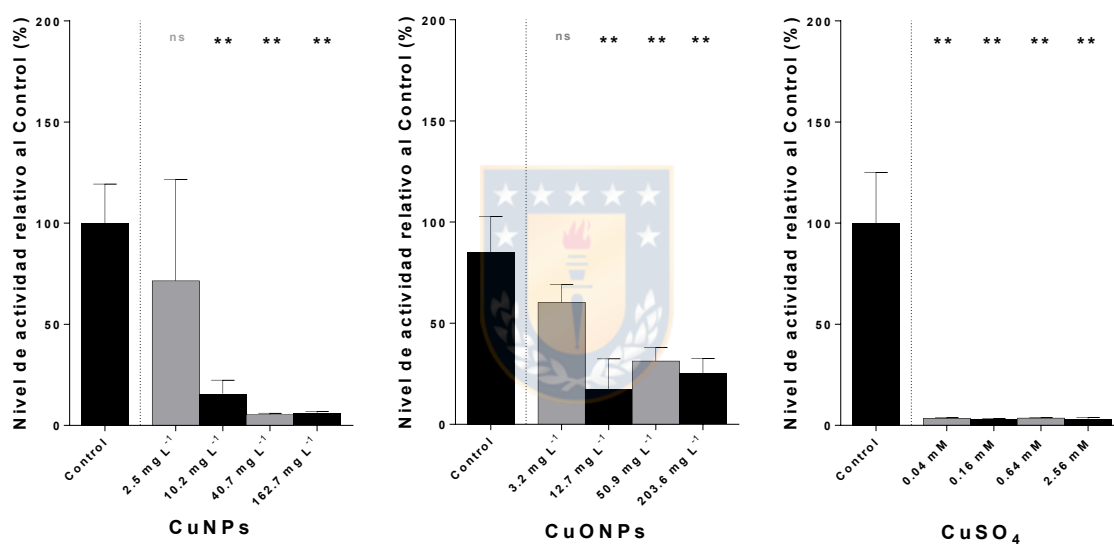


Figura 8. Cambios en la actividad metabólica de *N. winogradskyi* a 8 días de exposición en tratamientos con nanopartículas de cobre (CuNPs), nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) y sulfato de cobre (CuSO₄).

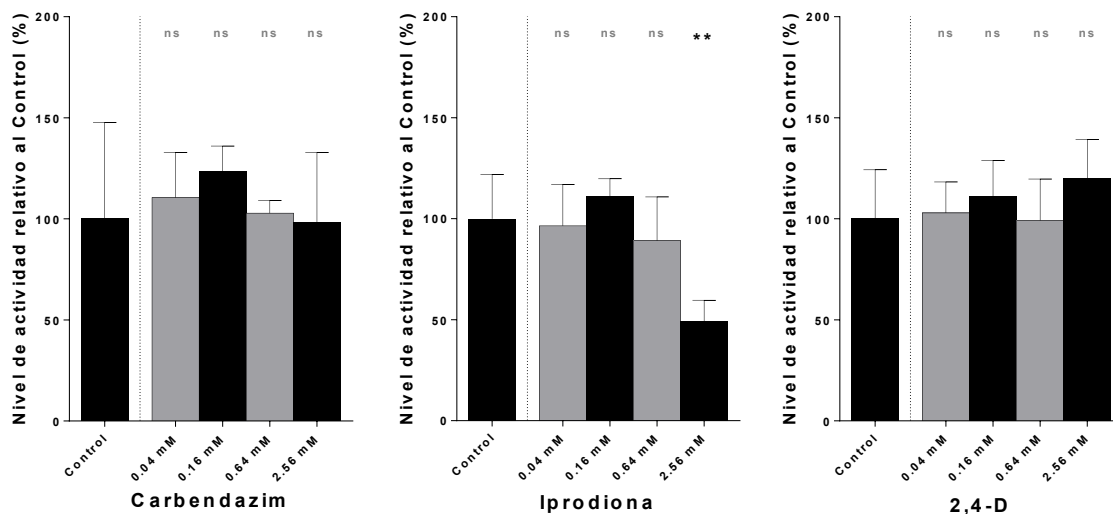


Figura 9. Cambios en la actividad metabólica de *N. winogradskyi* a 8 días generados por la exposición a tratamientos con los fungicidas iprodiona, carbendazim y el herbicida 2,4-D.

5.2 Tratamientos con fungicidas iprodiona, carbendazim y herbicida 2,4-D.

La actividad metabólica disminuyó en función a la concentración en tratamientos con iprodiona, sólo observándose un decrecimiento del 77.33% a una concentración de 2.56 mM. Respecto a los tratamientos con carbendazim, no exhibe efectos sobre la actividad metabólica, sin apreciarse diferencias significativas respecto al control. Los tratamientos con 2,4-D tampoco exhiben diferencias estadísticamente significativas.

Los tratamientos con fungicidas muestran menor efecto sobre la actividad metabólica cuando se comparan a los tratamientos con nanopartículas de cobre, solo en el tratamiento con Iprodiona se observaron diferencias significativas respecto al control.

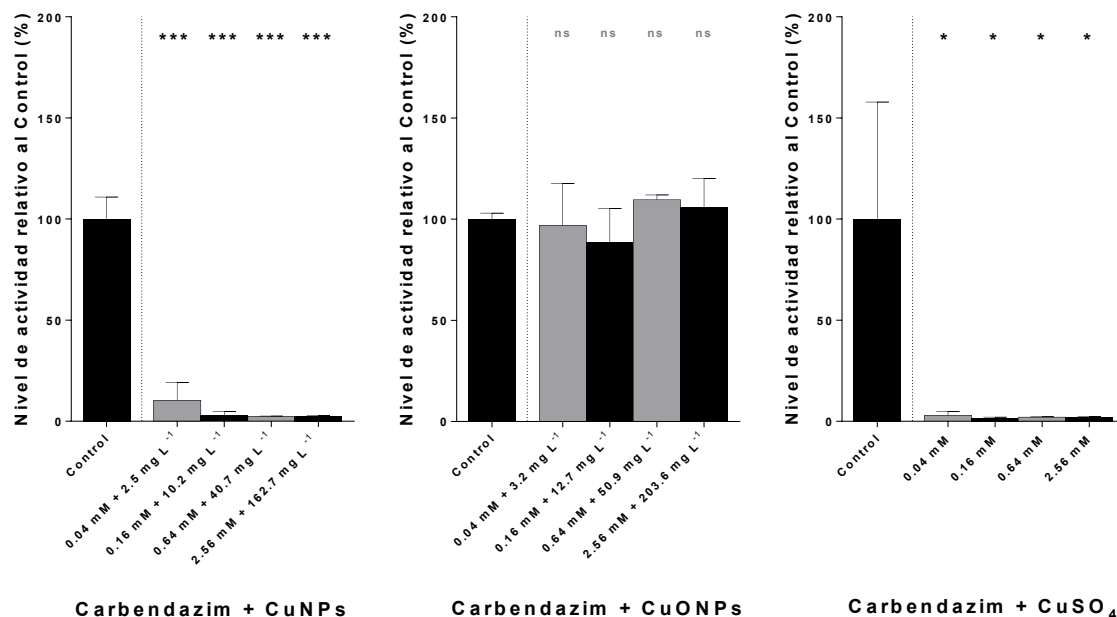


Figura 10. Cambios en la actividad metabólica de *N. winogradskyi* a 8 días generados por la exposición a tratamientos combinados con el fungicida carbendazim y especies cúpricas (CuNPs; Nanopartículas de cobre, CuONPs: Nanopartículas de óxido de cobre, CuSO₄: sulfato de cobre).

5.3 Tratamientos con fungicida carbendazim y especies químicas cúpricas (CuNPs, CuONPs, CuSO₄).

Para evaluar los efectos de las nanopartículas de cobre y plaguicidas sobre la actividad metabólica, se realizaron tratamientos combinados (plaguicidas y nanopartículas): siendo ensayados carbendazim + compuesto cúprico (CuNPs, CuONPs o CuSO₄) y iprodiona + compuesto cúprico. Respecto a los tratamientos de combinación carbendazim + CuNPs, se observa una disminución estadísticamente significativa de la actividad metabólica en todas las concentraciones ensayadas. carbendazim + CuNPs a una concentración de 0.04 mM + 2.5 mg L⁻¹ genera disminución de la actividad metabólica (-89.59%, valor-p= 0.0004) más acentuada que la disminución observada con 2.5 mg L⁻¹ de CuNPs (3.08%, valor-p=0.8108).

En el tratamiento combinado con carbendazim y CuSO₄ se observa una tendencia similar, sin embargo, la disminución generada a 0.04 mM es de 97.05% respecto al control (valor-p=0.044), en comparación, la disminución observada en el tratamiento con 0.04 mM de CuSO₄ fue del 96.59% (valor-p=0.0026). Apreciándose una tendencia similar en el resto de las concentraciones ensayadas. Respecto al tratamiento con carbendazim + CuONPs, solo en una de las distintas concentraciones ensayadas (0.64 mM + 50.9 mg L⁻¹ de Carbendazim + CuONPs) existieron diferencias significativas (valor-p=0.0125), detectándose un aumento del 9.57% respecto al control.

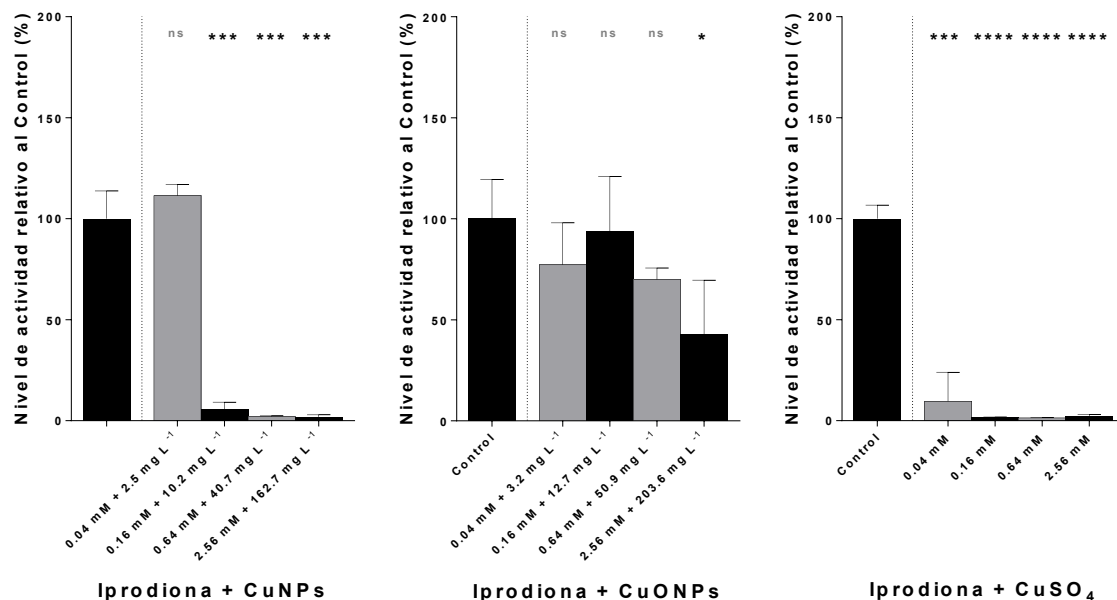


Figura 11. Cambios en la actividad metabólica de *N. winogradskyi* a 8 días generados por la exposición a tratamientos combinados con el fungicida iprodiona y especies cúpricas (CuNPs; Nanopartículas de cobre, CuONPs: Nanopartículas de óxido de cobre, CuSO₄: sulfato de cobre).

5.4 Tratamientos con fungicida iprodiona y especies químicas cúpricas (CuNPs, CuONPs, CuSO₄).

En los tratamientos con iprodiona + CuNPs (Figura 11), se observaron efectos similares sobre la actividad metabólica al compararse con los tratamientos con CuNPs, sin embargo, a una concentración de 0.04 mM + 2.5 mg L⁻¹ (iprodiona + CuNPs) la actividad metabólica fue mayor (+11.39%) a la observada a igual concentración con el tratamiento carbendazim + CuNPs (-89.59%). Los tratamientos con iprodiona y CuSO₄ exhiben un comportamiento inhibitorio similar al tratamiento con CuSO₄: a una concentración de 0.04 mM, se detectó una reducción de 90.38% de actividad respecto al control (valor-p=0.0006). Por otra parte, el tratamiento iprodiona + CuONPs posee diferencias significativas a concentraciones superiores a 0.64 mM + 50.9 mg L⁻¹ (disminución del 30.02%, valor-p=0.063).

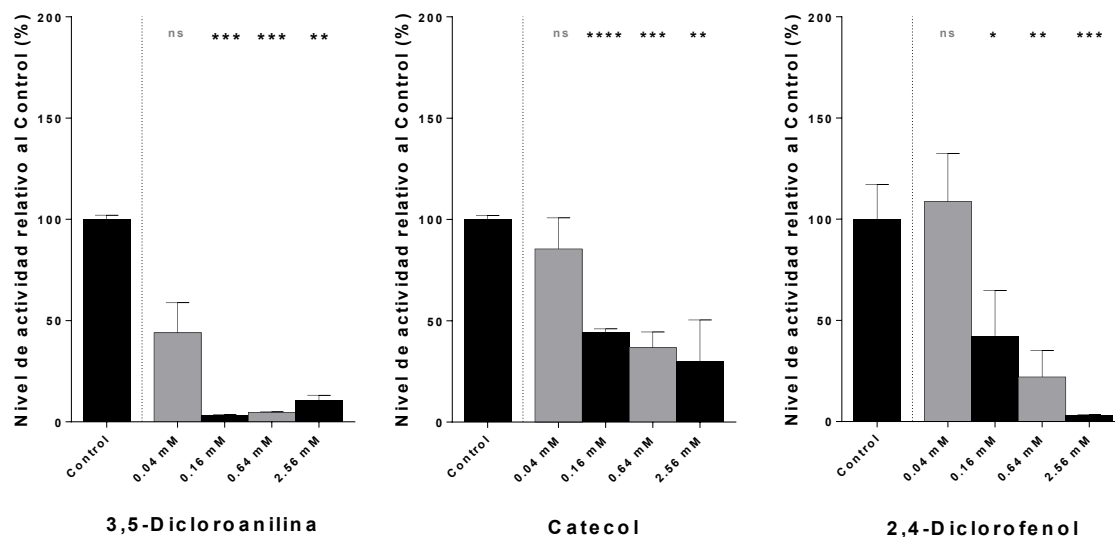


Figura 12. Cambios en la actividad metabólica de *N. winogradskyi* a 8 días generados por la exposición a tratamientos con los derivados biodegradativos, 3,5-dicloroanilina, catecol y 2,4-diclorofenol.

5.5 Tratamientos con derivados de plaguicidas, 3,5-dicloroanilina, catecol y 2,4-diclorofenol.

Los plaguicidas pueden persistir en el suelo o ser biodegradados, es por esto que se evaluaron los efectos de productos de biodegradación de carbendazim (catecol), iprodiona (3,5-dicloroanilina) y 2,4-D (2,4-diclorofenol) sobre la actividad metabólica de *N. winogradskyi*.

El tratamiento con 3,5-dicloroanilina (Figura 12) exhibió efectos inhibitorios cuando es comparado con iprodiona: hay una disminución >98% para dos de las concentraciones (0.16 mM, 0.64 mM) y de 94.47% para 2.56 mM, a diferencia de lo que ocurre con iprodiona, donde la disminución de la actividad fue de 77.33% a una concentración de 2.56 mM.

Para los tratamientos con Catecol, a una concentración de 0.04 mM se observó una disminución del 14.48%, (no significativa). Mientras que para concentraciones de 0.16 mM y 0.64 mM, la disminución fue de 55.58% y 63.33%, a 2.56 mM, la disminución fue de 70.28% de la actividad en comparación al control. Catecol muestra un comportamiento inhibitorio cuando se compara con su compuesto de origen (carbendazim).

Por otra parte, 2,4-diclorofenol exhibe un comportamiento similar a catecol, sin embargo, a 0.04 mM, se observó un aumento de la actividad metabólica (8.64 mM) con respecto al control (no significativa). En las concentraciones de 0.16 mM y 0.64 mM, la disminución fue de 57.59% y 77.97%. A una concentración de 2.56 mM, se produjo una disminución del 96.85%.

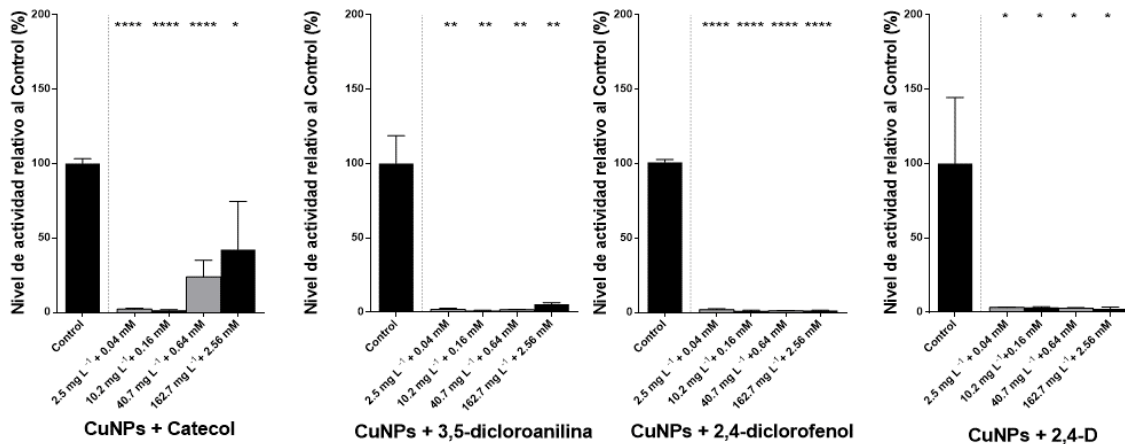


Figura 13. Cambios en la actividad metabólica de *N. winogradskyi* a 8 días generados por la exposición a tratamientos combinados entre los derivados biodegradativos (3,5-dicloroanilina, catecol, 2,4-diclorofenol) y nanopartícula de cobre metálico (CuNPs).

5.6 Tratamientos con derivados de plaguicidas (3,5-dicloroanilina, catecol y 2,4-diclorofenol) junto a CuNPs.

El tratamiento CuNPs + catecol (Figura 13) muestra inhibición de la actividad metabólica a concentraciones de 2.5 mg L⁻¹ + 0.04 mM (97.76%) y 10.2 mg L⁻¹ + 0.16 mM (98.60%), mientras que a 40.7 mg L⁻¹ + 0.64 mM, la actividad se redujo un 76.04%, y a 162.7 mg L⁻¹ + 2.56 mM, la actividad disminuyó un 57.84%.

El tratamiento con CuNPs + 3,5-dicloroanilina mostró una disminución del 98.07%, 98.69% y 98.23% para las concentraciones 2.5 mg L⁻¹ + 0.04 mM, 10.2 mg L⁻¹ + 0.16 mM y 40.7 mg L⁻¹ + 0.64 mM, respectivamente. Mientras que a 162.7 mg L⁻¹ + 2.56 mM, la disminución fue del 94.47%.

Los ensayos con 2,4-diclorofenol + CuNPs generaron una disminución similar a los ensayos con 2,4-D y CuNPs: a una concentración de 2.5 mg L⁻¹ + 0.04 mM de 2,4-D + CuNPs se observó una disminución del 96.64%, mientras que a 2.5 mg L⁻¹ + 0.04 mM de CuNPs + 2,4-diclorofenol, la actividad metabólica disminuyó un 98.10%.

Esta tendencia se mantiene en el resto de las concentraciones superiores en ambos tratamientos, habiendo para CuNPs + 2,4-D 10.2 mg L⁻¹ + 0.16 mM, 40.7 mg L⁻¹ + 0.64 mM y 162.7 mg L⁻¹ + 2.56 mM, una disminución del 96.55%, 97.15% y 97.62%, respectivamente. Para CuNPs + 2,4-diclorofenol, hubo una disminución del 98.91%, 98.86% y 98.65% para las concentraciones 10.2 mg L⁻¹ + 0.16 mM, 40.7 mg L⁻¹ + 0.64 mM y 162.7 mg L⁻¹ + 2.56 mM, respectivamente.

Tabla 4. Estimación de IC₅₀ (inhibición de la actividad metabólica) de compuestos químicos ensayados sobre *Nitrobacter winogradskyi*.

Tratamiento Evaluado	Tipo de Tratamiento	IC ₅₀ (mM) estimada
CuNPs	Cobre	≤2.5 mg L ⁻¹
CuONPs	Cobre	31.81 mg L ⁻¹
CuSO ₄	Cobre	≤0.04 mM
Carbendazim	Plaguicida (Fungicida)	≥2.56 mM
Iprodiona	Plaguicida (Fungicida)	0.83 mM
2,4-D	Plaguicida (Herbicida)	≥2.56 mM
3,5-dicloroanilina	Plaguicida Derivado	0.26 mM
Catecol	Plaguicida Derivado	0.74 mM
2,4-diclorofenol	Plaguicida Derivado	0.85 mM
Carbendazim + CuNPs (1:1)	Fungicida + Cobre	≤0.04 mM + ≤ 2.5 mg L ⁻¹
Carbendazim + CuONPs (1:1)	Fungicida + Cobre	0.92 mM + 73.18 mg L ⁻¹
Carbendazim + CuSO ₄ (1:1)	Fungicida + Cobre	≤0.04 mM
Iprodiona + CuNPs (1:1)	Fungicida + Cobre	≤0.04 mM + ≤ 2.5 mg L ⁻¹
Iprodiona + CuONPs (1:1)	Fungicida + Cobre	1.26 mM + 100.22 mg L ⁻¹
Iprodiona + CuSO ₄ (1:1)	Fungicida + Cobre	≤0.04 mM
2,4-D + CuNPs (1:1)	Herbicida + Cobre	≤0.04 mM + ≤ 2.5 mg L ⁻¹
3,5-dicloroanilina + CuNPs (1:1)	Derivado de Plaguicidas + Cobre	0.08 mM + 5.08 mg L ⁻¹
Catecol + CuNPs (1:1)	Derivado de Plaguicidas + Cobre	0.46 mM + 29.23 mg L ⁻¹
2,4-diclorofenol + CuNPs (1:1)	Derivado de Plaguicidas + Cobre	≤0.04 mM + ≤ 2.5 mg L ⁻¹

5.7 Resultados de estimación de IC₅₀ para los distintos compuestos evaluados.

Las concentraciones para inhibir el 50% de la actividad metabólica (IC₅₀) fueron calculadas para cada compuesto y tratamiento combinado utilizando un modelo de regresión polinomial (Tabla 3). Para CuNPs y CuSO₄ se estimó un valor menor que 0.04 mM, mientras que para CuONPs se estimó una IC₅₀ = 31.81 mg L⁻¹ (0.40 mM). Para los tratamientos de combinación plaguicidas y nanopartículas, se observó que tanto para carbendazim como iprodiona + CuNPs o CuSO₄, la IC₅₀ estimada fue ≤ 0.04 mM, mientras que para los tratamientos con carbendazim + CuONPs e iprodiona + CuONPs, las IC₅₀ fueron de 0.92 mM + 73.18 mg L⁻¹ y 1.26 mM + 100.22 mg L⁻¹, respectivamente.

En el caso de los plaguicidas, se calculó para carbendazim y 2,4-D una IC₅₀ mayor que 2.56 mM y para iprodiona se estimó una IC₅₀ = 0.83 mM. Cuando se compara la IC₅₀ calculada para los tratamientos combinados de fungicidas y nanopartículas, se puede observar que las combinaciones fungicida + CuNPs y fungicida + CuSO₄ tienen IC₅₀ menores a 0.04 mM (+ 2.5 mg L⁻¹), mientras que para tratamientos con CuONPs, la IC₅₀ es mayor (carbendazim + CuONPs, IC₅₀ = 0.92 mM + 73.18 mg L⁻¹, iprodiona + CuONPs, IC₅₀ = 1.26 mM + 100.22 mg L⁻¹).

Los derivados de plaguicidas mostraron IC₅₀ más bajas. Por ejemplo, la IC₅₀ estimada para 3,5-dicloroanilina fue 3.19 veces menor que iprodiona, y para catecol la IC₅₀ fue 3.46 veces menor que carbendazim. Sin embargo, al comparar las IC₅₀ de derivados de plaguicida + CuNPs, se observa que la IC₅₀ estimada para 3,5-dicloroanilina + CuNPs es 3.25 veces más pequeña que la IC₅₀ para 3,5-dicloroanilina y 10.38 veces más pequeña que la IC₅₀ reportada para iprodiona, en el caso de catecol + CuNPs la IC₅₀ calculada fue 1.65 veces más pequeña que la reportada para catecol y 5.49 veces más pequeña que la calculada para carbendazim.

5.8 Test de Scheirer-Ray-Hare (SRH) para evaluación de efectos aditivos en modelos con interacción de dos compuestos sobre la actividad metabólica de *Nitrobacter winogradskyi*.

Tabla 5.1-3. Resultados de Análisis SRH para ensayos de combinaciones con carbendazim, CuNPs, CuONPs y CuSO₄.

Test SRH, serie Carbendazim									
5.1					5.2				
	Df	Sum Sq	H	p.value		Df	Sum Sq	H	p.value
CuNPs	4	3644.0	28.0	1.0E-05	CuONPs	4	1113.2	8.6	0.073
Carbendazim	4	402.6	3.1	0.542	Carbendazim	4	2360.8	18.2	0.001
Mixture	4	389.6	3.0	0.558	Mixture	4	400.7	3.1	0.544
Residuals	26	503.3			Residuals	26	1065.3		

5.3				
	Df	Sum Sq	H	p.value
CuSO ₄	4	3589.8	27.6	1.0E-05
Carbendazim	4	393.6	3.0	0.553
Mixture	4	294.4	2.3	0.687
Residuals	26	658.3		

Nota. Nanopartículas de cobre (CuNPs), Nanopartículas de óxido de Cobre (CuONPs) y Sulfato de Cobre (II) (CuSO₄). *Df* (grados de libertad), *Sum Sq* (Suma de cuadrados), *H* estadístico, *p.value* (valor de p.).

El resultado del test no paramétrico de Scheirer-Ray-Hare (SRH) indica que para el primer tratamiento de combinación (tabla 5.1), CuNPs es el factor más significativo, mientras que Carbendazim y la combinación CuNPs + Carbendazim no es significativa. En la tabla 5.2 se observa que Carbendazim sería el factor significativo, mientras que en la tabla 5.3 CuSO₄ sería el único factor significativo.

Tabla 6.1-3. Resultados de Análisis SRH para ensayos de combinaciones con Iprodion, CuNPs, CuONPs y CuSO₄.

Test SRH, serie Iprodiona									
6.1					6.2				
	Df	Sum Sq	H	p.value		Df	Sum Sq	H	p.value
CuNPs	4	3513.5	27.0	2.0E-05	CuONPs	4	1788.8	13.8	0.008
Iprodione	4	651.9	5.0	0.286	Iprodione	4	719.6	5.5	0.237
Mixture	4	151.2	1.2	0.884	Mixture	4	1221.5	9.4	0.052
Residuals	26	623.0			Residuals	26	1208.7		

6.3

	Df	Sum Sq	H	p.value
CuSO ₄	4	3313.4	25.5	4.0E-05
Iprodione	4	793.5	6.1	0.191
Mixture	4	188.1	1.4	0.836
Residuals	26	640.0		

Nota. Nanopartículas de cobre (CuNPs), Nanopartículas de óxido de Cobre (CuONPs) y Sulfato de Cobre (II) (CuSO₄). *Df* (grados de libertad), *Sum Sq* (Suma de cuadrados), *H* estadístico, *p.value* (valor de p.).

En la tabla 6.1 se observa que el único factor significativo es CuNPs, mientras que ni Iprodiona ni la mezcla CuNPs + Iprodiona son significativos. En la tabla 6.2 el análisis sugiere que solo CuONPs sería el único factor significativo. En la tabla 6.3 CuSO₄ sería el único factor significativo.

Tabla 7.1-4. Resultados Análisis SRH para ensayos de combinaciones entre CuNPs, junto a 2,4-D, 2,4-diclorofenol, 3,5-dicloroanilina y catecol.

Resultado de test SRH, serie CuNPs									
7.1					7.2				
	Df	Sum Sq	H	p.value		Df	Sum Sq	H	p.value
CuNPs	4	3288.0	25.3	4.0E-05	CuNPs	4	1929.6	14.8	0.005
24D	4	706.0	5.4	0.246	24DCF	4	2108.5	16.2	0.003
Mixture	4	443.8	3.4	0.491	Mixture	4	705.3	5.4	0.246
Residuals	26	501.7			Residuals	26	196.7		
7.3					7.4				
	Df	Sum Sq	H	p.value		Df	Sum Sq	H	p.value
CuNPs	4	1338.6	10.3	0.036	CuNPs	4	2081.9	16.0	0.003
35DCA	4	1403.2	10.8	0.029	CAT	4	625.2	4.8	0.307
Mixture	4	1005.5	7.7	0.102	Mixture	4	1577.5	12.1	0.016
Residuals	26	1192.2			Residuals	26	654.0		

Nota. Nanopartículas de Cobre (CuNPs) con 2,4-D (24D) (7.1); 2,4-diclorofenol (24DCF) (7.2); 3,5-dicloroanilina (35DCA) (7.3) y catecol (CAT) (7.4). *Df* (grados de libertad), *Sum Sq* (Suma de cuadrados), *H* estadístico, *p.value* (valor-p.).

En la tabla 7.1 el único factor significativo fue CuNPs, mientras que en la tabla 7.2 tanto CuNPs como 2,4-diclorofenol fueron significativos, pero no los tratamientos combinados de ambos. En la tabla 7.3 tanto CuNPs como 3,5-dicloroanilina fueron detectados como factores significativos. En la tabla 7.4, el único factor significativo fue CuNPs, pero la mezcla Catecol y CuNPs también.

5.9 Análisis para evaluación de sinergia y efectos aditivos sobre la actividad metabólica de *Nitrobacter winogradskyi*: evaluación de aditividad de Loewe y *Highest Single Agent Model* (HSA).

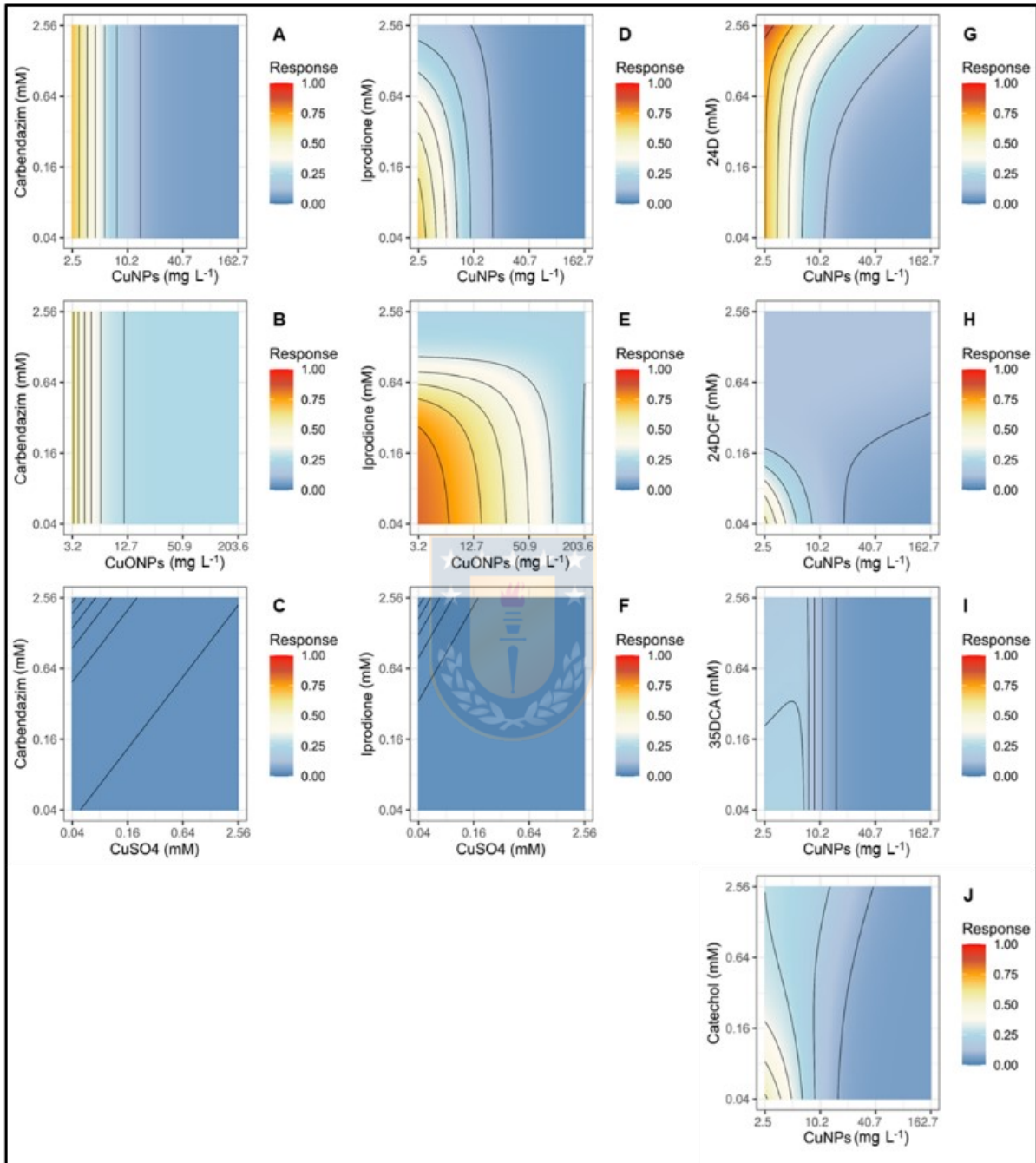


Figura 14. Isobogramas del modelo de Aditividad de Loewe. Respuesta en rango desde 0 (azul - sin actividad) a 1 (rojo - máxima actividad), serie Carbendazim (A-C), serie Iprodiona (D-F), serie Derivados (G-J).

Los isobogramas generados grafican una escala de respuesta normalizada que va desde 0 (actividad muy baja) a 1 (actividad muy alta). Los resultados del modelo de Loewe (Figura 14), y modelo HSA (Figura 15) son representaciones del espacio de actividad metabólica dado un gradiente de concentración entre dos compuestos. Se observan diferencias entre el grado de resolución de espacio entre ambos modelos, sin embargo, los isobogramas presentan tendencias similares cuando se comparan los mismos resultados de cada tratamiento entre ambos modelos.

La predicción en el isobograma A (Carbendazim + CuNPs) muestra que el nivel de actividad metabólica se vería afectado por CuNPs y no por carbendazim, similar a lo que ocurre en el isobograma B (Carbendazim + CuONPs). La predicción en los isobogramas D (Iprodiona + CuNPs) y E (Iprodiona + CuONPs) muestra que el nivel de actividad metabólica se vería afectado por ambos compuestos. Sin embargo, el nivel de actividad metabólica predicha en el isobograma E sería mayor que el isobograma D.

Los isobogramas C (Carbendazim + CuSO₄) y F (Iprodione + CuSO₄) muestran que la actividad metabólica predicha sería baja.

El isobograma G muestra que el nivel de actividad metabólica se vería más afectada por CuNPs que por 2,4-D. Los isobogramas H (2,4-diclorofenol + CuNPs), I (3,5-dicloroanilina + CuNPs) y J (Catecol + CuNPs) muestran que la actividad metabólica modelada sería afectada por ambos compuestos.



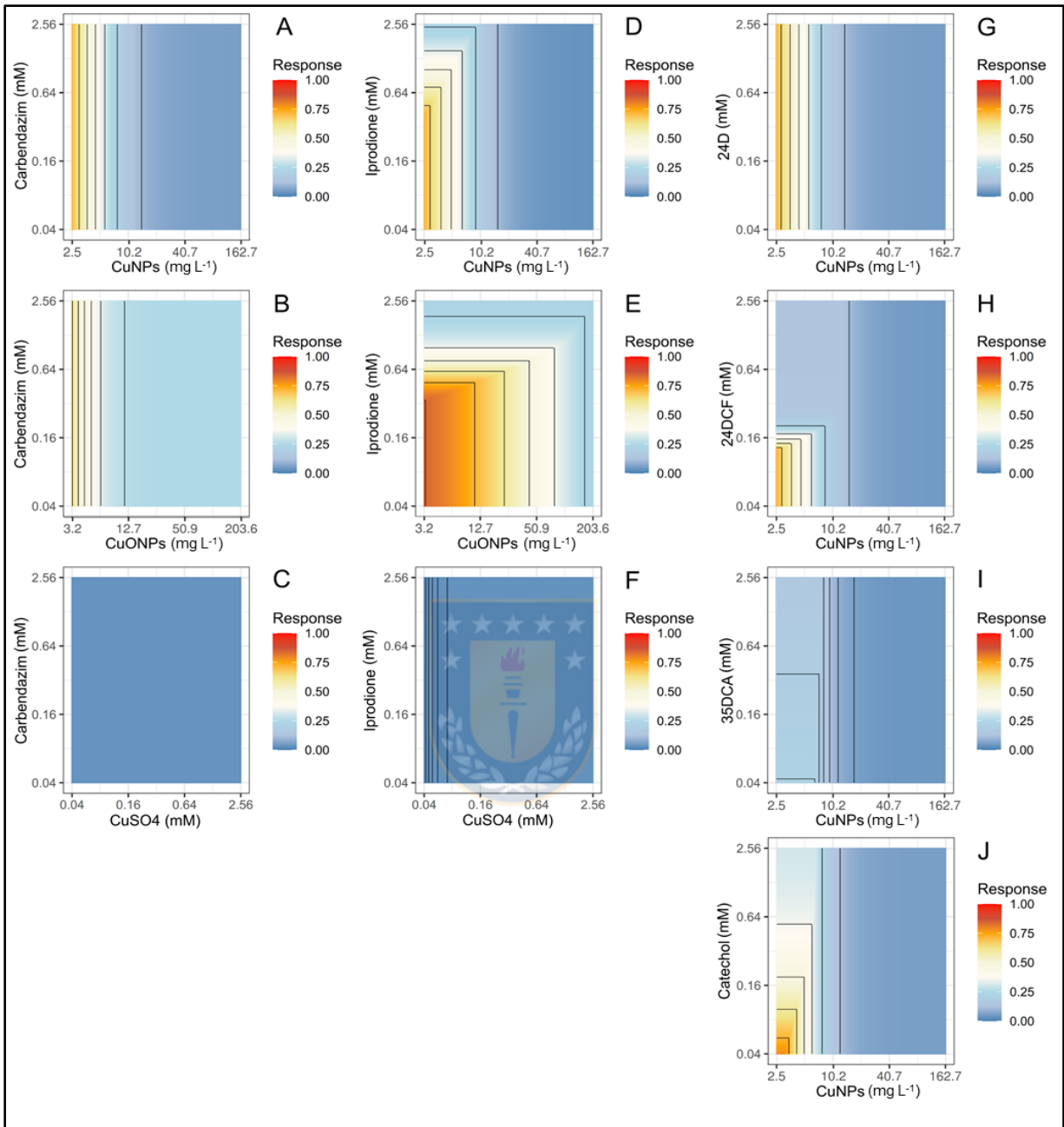


Figura 15. Isobogramas del modelo Highest Single Agent (HSA). Respuesta en rango desde 0 (azul - sin actividad) a 1 (rojo - máxima actividad), serie Carbendazim (A-C), serie Iprodiona (D-F), serie derivados biodegradativos (G-J).

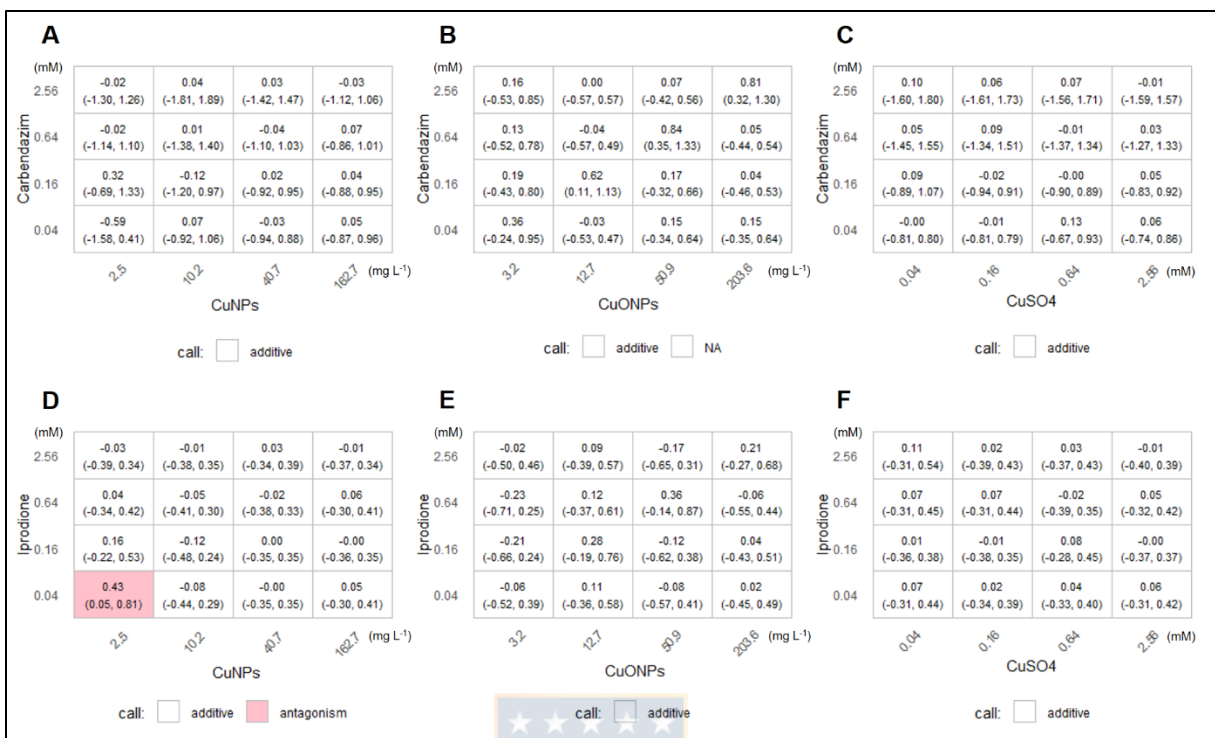


Figura 16. Tablas de Aditividad, modelo de Loewe, para series Carbendazim (A-C) e Iprodiona (D-F). **A.** Carbendazim + CuNPs, **B.** Carbendazim + CuONPs, **C.** Carbendazim + CuSO₄. **D.** Iprodiona + CuNPs, **E.** Iprodiona + CuONPs, **F.** Iprodiona + CuSO₄.

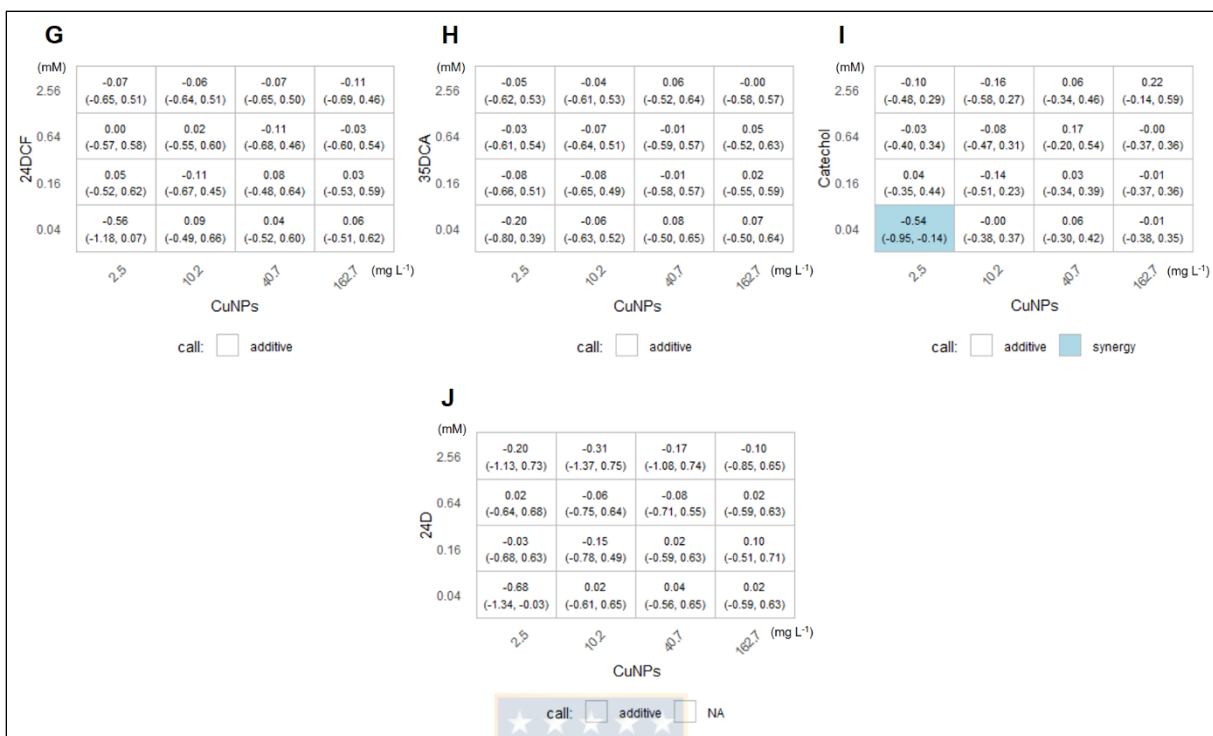


Figura 17. Tablas de Aditividad, modelo de Loewe, para series CuNPs y compuestos derivados (G-J). **G.** 2,4-diclorofenol + CuNPs, **H.** 3,5-dicloroanilina + CuNPs, **I.** Catecol + CuNPs, **J.** 2,4-D + CuNPs.

Las tablas de aditividad de Loewe indican, de forma estadística, si existe aditividad, antagonismo o sinergia de las distintas combinaciones de compuestos ensayados sobre la actividad. En la serie Carbendazim (tablas A-C) se observa que para todas las concentraciones existiría aditividad. En la serie Iprodiona (tablas D-F) se observa antagonismo entre iprodiona y CuNPs a una concentración de 0.04 mM + 2.5 mg L⁻¹ de ambos compuestos. Para el resto de combinaciones, el análisis sugiere efectos aditivos.

En la serie CuNPs (Figura 17) se observa sinergismo para catecol y CuNPs (tabla I) a una concentración de 0.04 mM + 2.5 mg L⁻¹ de ambos compuestos, mientras que, para el resto de las otras combinaciones de concentraciones, el análisis sugiere aditividad.

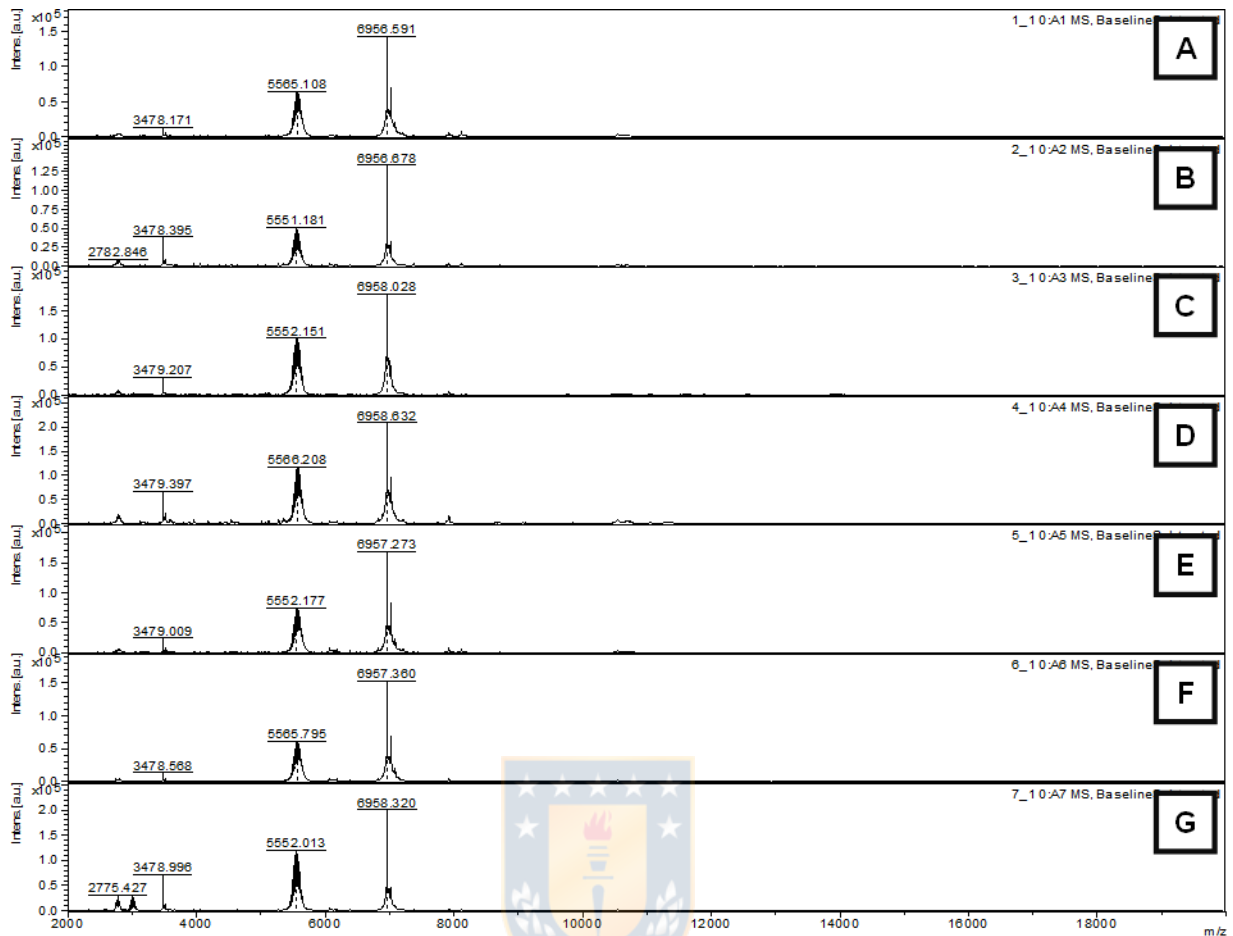


Figura 18. Cambios en el perfil de proteínas de *N. winogradskyi* generados por exposición a tratamientos, obtenido por MALDI-TOF/TOF MS. Izquierda: Perfil principal, Derecha: detalle de perfiles. **A.** Control, **B.** Nanopartículas de cobre metálico (CuNPs), **C.** Carbendazim, **D.** Iprodiona, **E.** Nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), **F.** Iprodiona + CuNPs, **G.** Carbendazim + CuNPs.

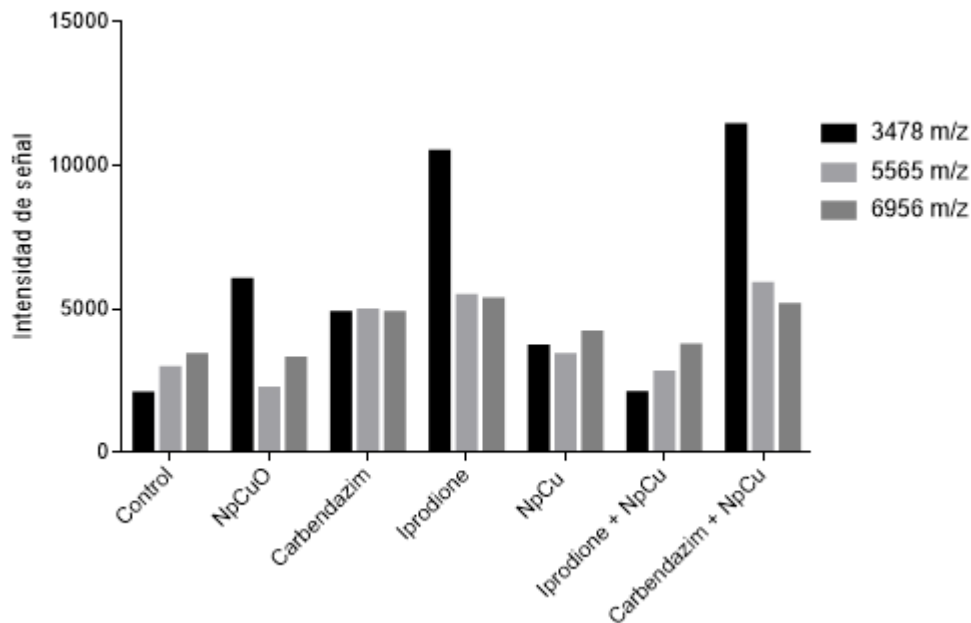


Figura 19. Comparación de principales *peaks* de intensidad de señal en perfiles proteicos obtenidos por MALDI-TOF/TOF MS para distintos tratamientos ensayados.

Tabla 8. Prueba t para comparación entre principales *peaks* de intensidad de señal generados en perfiles proteicos obtenidos por MALDI-TOF/TOF MS.

Valor de p para diferentes tratamientos					
CuONPs	CAR	IPR	CuNPs	IPR+CuNPs	CAR+CuNPs
0.5535	0.0331	0.1744	0.1122	0.7034	0.1865

5.10 Resultados de Análisis MALDI-TOF/TOF MS.

Se realizó un análisis MALDI-TOF/TOF MS para cada IC_{50} calculada de cada tratamiento, con el objeto de conocer si existen respuestas asociadas a un perfil característico de cada condición. Todas las muestras poseen tres *peaks* característicos a 3478, 5565 y 6956 m/z (Figura 18), cuya intensidad de señal fluctúa entre las 1000 y 12000 u.a. Al realizar una prueba t (Tabla 7) para examinar diferencias entre tratamientos y el control se observó que carbendazim es el único tratamiento con diferencias significativas.

Multivariate Permutation, method = binomial

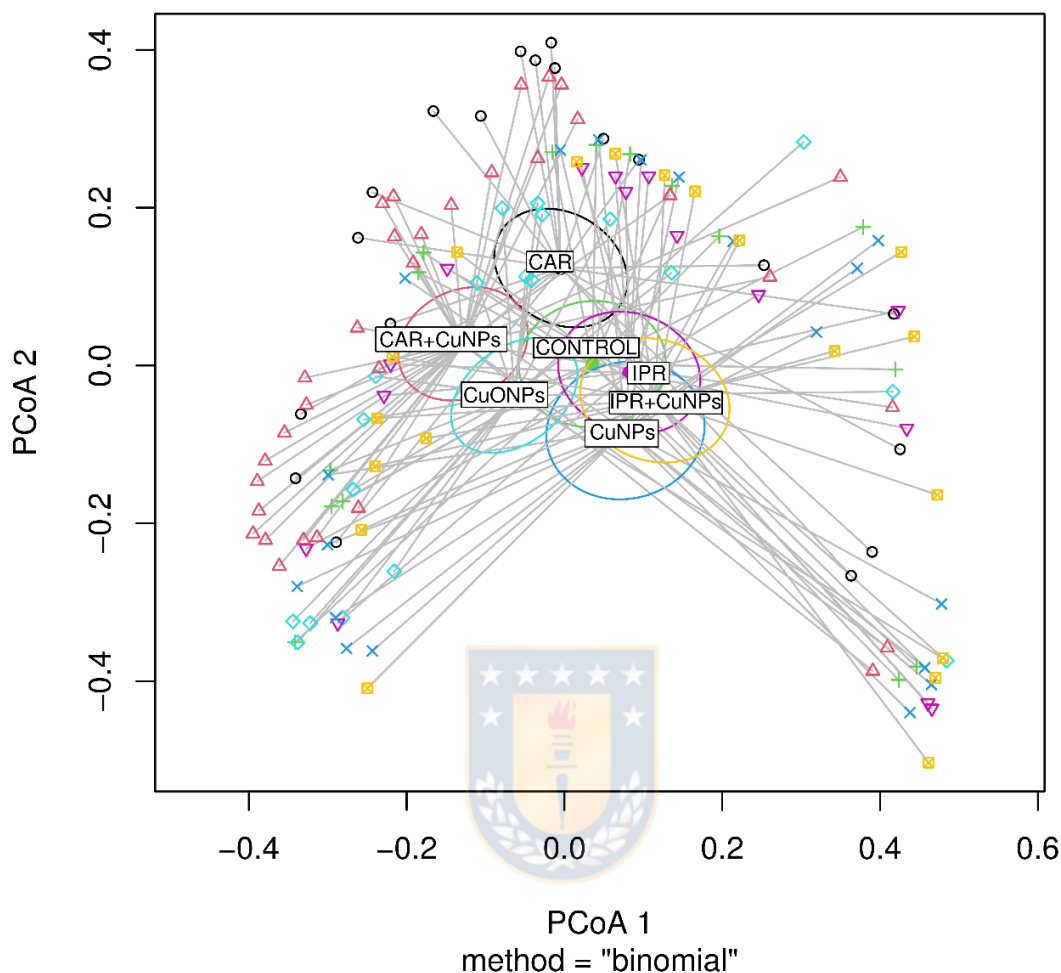


Figura 20. PCoA (Análisis de Componentes Principales) generado a partir de Análisis multivariado no-paramétrico de permutación de la varianza (PERMANOVA) realizado para *peaks* mayores a 500 m/z desde análisis MALDI-TOF MS/MS. Método Binomial. CAR: carbendazim, IPR: iprodiona, CuNPs: Nanopartícula de Cobre metálico, CuONPs: Nanopartícula de Óxido de Cobre.

5.11 Análisis PERMANOVA de perfiles para MALDI-TOF/TOF MS.

El análisis de permutación de la varianza (PERMANOVA) es un análisis estadístico no-paramétrico que sirve para medir la respuesta simultánea de muchas variables sobre varios factores, y es usado para comparar grupos de objetos basados en cálculo de distancias (también llamadas matrices de disimilitudes) (Anderson, 2017). Cada uno de los puntos y líneas representan las distancias entre cada *peak* de intensidad y el conjunto de *peaks* que pertenece a cada tratamiento (representado por etiquetas en la Figura 20), y las distancias entre los tratamientos representan la similitud que poseen (el patrón observado en el perfil obtenido por MALDI-TOF/TOF MS), y las elipses representan los intervalos de confianza (0.95) para cada tratamiento.

El test de permutación arrojó como resultado que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.505$, $F=0.857$, $df=6$). Posteriormente, en el análisis de comparación por pares, se estableció que solo la muestra del tratamiento CAR (carbendazim) posee diferencias significativas respecto al control.

Tabla 9. Resultados del test de PERMANOVA y Comparación por pares entre tratamientos

Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions							
Permutation: free							
Number of permutations: 999							
Response: Distances							
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	N.Perm	Pr (> F)	
Groups	6	0.0378	0.0063	0.857	999	0.505	
Residuals	131	0.9633	0.0074				
Signif. codes: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1							
Pairwise comparisons: (Observed p-value below diagonal, permuted p-value above diagonal)							
	CAR	CAR+CuNPs	CONTROL	CuNPs	CuONPs	IPR	IPR+CuNPs
CAR		0.597	0.032	0.164	0.186	0.690	0.375
CAR+CuNPs	0.617		0.553	0.578	0.973	0.099	0.973
CONTROL	0.030	0.168		0.940	0.397	0.590	0.617
CuNPs	0.538	0.973	0.105		0.960	0.154	0.448
CuONPs	0.172	0.399	0.589	0.392		0.082	0.233
IPR	0.568	0.953	0.166	0.974	0.469		0.684
IPR+CuNPs	0.943	0.695	0.084	0.656	0.255	0.676	

Nota. En comparación de pares (*pairwise comparisons*), se informa el valor p observado (bajo la diagonal) y el valor de p permutado (sobre la diagonal). En negrita, valores de $p < 0.05$, indican diferencias significativas entre tratamientos. CAR: carbendazim, IPR: iprodiona, CuNPs: nanopartículas de cobre, CuONPs: nanopartículas de óxido de cobre. Df: grados de libertad, Sum Sq: suma de cuadrados, Mean Sq: promedio de cuadrados, F: estadístico, N. Perm: número de permutaciones, Pr (>F): valor.p.

La dispersión observada en el gráfico muestra al control en el centro, y cerca de este se observa a iprodiona, seguida de iprodiona + CuNPs y CuNPs, siendo estos tratamientos los que tendrían una mayor similitud de respuesta por parte de *N. winogradskyi*. Por otra parte, el tratamiento CuONPs muestra una menor similitud respecto al control, al igual que el tratamiento con carbendazim y carbendazim + CuNPs.

En el análisis de comparación por pares se observó que los tratamientos carbendazim + CuNPs e iprodiona serían los tratamientos con un mayor número de diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos y el control.

5.12 Análisis de Datos para perfiles de MALDI-TOF/TOF MS.

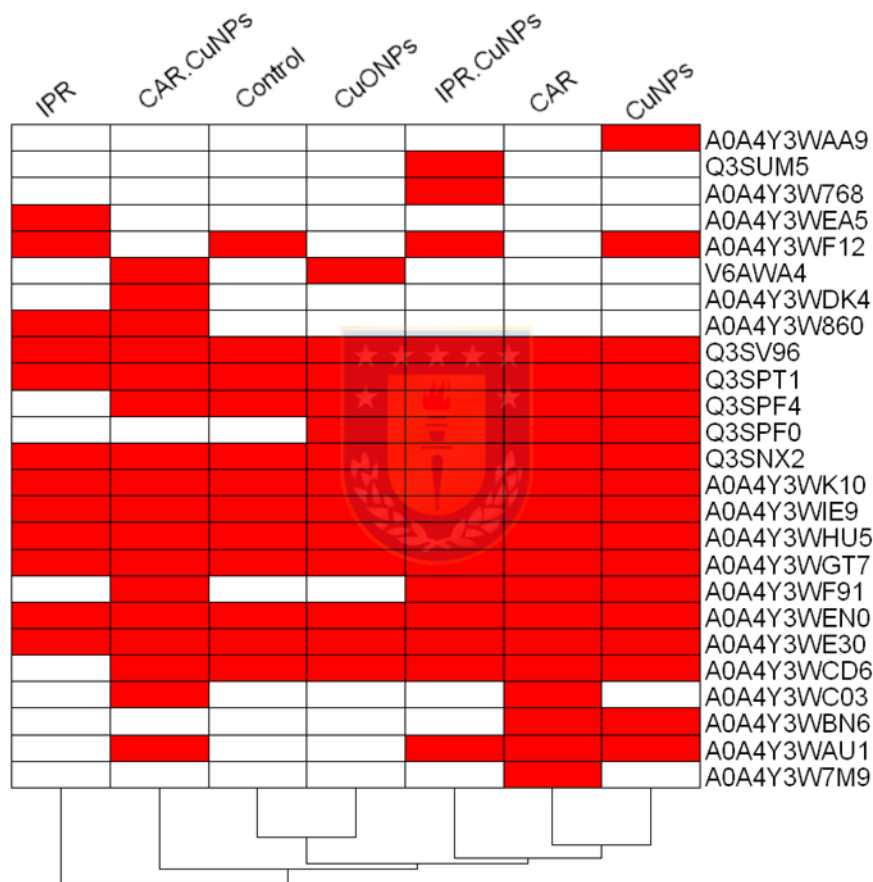


Figura 21. Heatmap generado a partir de proteínas predichas desde la base de datos UNIPROT, para *peaks* mayores a 500 m/z, obtenidos desde análisis MALDI-TOF MS/MS. IPR: iprodiona, CAR.CuNPs: carbendazim + CuNPs, Control, CuONPs: Nanopartícula de Óxido de Cobre, IPR.CuNPs: Iprodiona + CuNPs, CAR: carbendazim, CuNPs: Nanopartícula de Cobre metálico.

El *heatmap* representa a los hallazgos de proteínas predichas en el registro de UNIPROT para cada tratamiento. El dendrograma representa la similitud entre grupos de tratamientos considerando la presencia en común de distintos grupos de proteínas (distancias euclidianas). Los nombres en el eje “y” corresponden a los nombres de entrada de las proteínas registradas en UNIPROT.

Tabla 10. Lista de Proteínas detectadas en base de datos UNIPROT.

ID UNIPROT	ESTADO	GEN	NOMBRE PROTEÍNA	TAMAÑO	MASA	pl
A0A4Y3WAA9	unreviewed	NWI01_14270	Uncharacterized protein	47	5649.468	9.307171
Q3SUM5	unreviewed	Nwi_0751	HIG1 domain-containing protein	64	7083.823	12.80743
A0A4Y3W768	unreviewed	NWI01_03400	Uncharacterized protein	62	6917.041	9.866122
A0A4Y3WEA5	unreviewed	NWI01_28770	Uncharacterized protein	51	5675.564	10.56615
A0A4Y3WF12	unreviewed	NWI01_33750	Uncharacterized protein	63	6977.117	12.14132
V6AWA4	unreviewed	Tag enc. tmRNA	Proteolysis tag peptide encoded tmRNA (Frag.)	12	1204.246	3.749972
A0A4Y3WDK4	unreviewed	NWI01_30040	Uncharacterized protein	62	6976.812	11.1857
A0A4Y3W860	unreviewed	NWI01_10760	Uncharacterized protein	65	7024.172	5.723676
Q3SV96	unreviewed	Nwi_0528	Uncharacterized protein	66	6934.013	10.31935
Q3SPT1	unreviewed	Nwi_2457	Uncharacterized protein	50	5538.275	4.66497
Q3SPF4	unreviewed	Nwi_2584	Uncharacterized protein	51	5547.944	10.45513
Q3SPF0	unreviewed	Nwi_2588	Uncharacterized protein	62	7017.03	11.53345
Q3SNX2	unreviewed	Nwi_2766	Uncharacterized protein	51	5626.935	11.4308
A0A4Y3WK10	unreviewed	NWI01_35680	Uncharacterized protein	52	5582.612	8.239544
A0A4Y3WIE9	unreviewed	NWI01_35610	Uncharacterized protein	42	4434.188	6.425915
A0A4Y3WHU5	unreviewed	NWI01_33710	Uncharacterized protein	52	5524.358	5.669753
A0A4Y3WGT7	unreviewed	NWI01_32120	Uncharacterized protein	51	5556.259	10.47183
A0A4Y3WF91	unreviewed	NWI01_27130	Uncharacterized protein	50	5482.17	9.165677
A0A4Y3WEN0	unreviewed	NWI01_15880	Uncharacterized protein	63	6955.315	6.647179
A0A4Y3WE30	unreviewed	NWI01_25840	Uncharacterized protein	51	5592.919	11.4308
A0A4Y3WCD6	unreviewed	NWI01_25840	Uncharacterized protein	50	5491.285	9.347669
A0A4Y3WC03	unreviewed	NWI01_23460	Cytochrome c oxidase subunit IV	50	5471.194	4.225549
A0A4Y3WBN6	unreviewed	NWI01_17700	Uncharacterized protein	61	6971.841	4.828015
A0A4Y3WAU1	unreviewed	NWI01_20490	Uncharacterized protein	51	5633.245	4.401677
A0A4Y3W7M9	unreviewed	NWI01_08860	Uncharacterized protein	47	5649.468	9.307171

Nota. Proteínas detectadas en base de datos UNIPROT usando *peaks* mayores a 500 m/z detectados por MALDI-TOF/TOF MS, compartidos entre los diferentes tratamientos, pl: punto isoeléctrico calculado.

El resultado del análisis presentado en tabla muestra que las proteínas en su mayoría no tienen una función conocida y están escasamente caracterizadas. La mayoría de las secuencias peptídicas varían entre 65 y 40 residuos de aminoácidos. Mayores detalles pueden ser consultados en la sección de Anexos. El análisis de clúster representado por el dendrograma indicó que Control y CuONPs son los tratamientos que poseen más similitud en el patrón de expresión, mientras que los tratamientos con mayores diferencias de expresión respecto al control sería Iprodiona, CuNPs y Carbendazim.

DISCUSIÓN

6.1 Nanopartículas de cobre metálico (CuNPs) y Nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) difieren en la generación de efectos sobre la actividad metabólica de *Nitrobacter winogradskyi*.

Cuando comparamos los niveles de actividad metabólica en los tratamientos con nanopartículas de cobre (CuNPs) y sulfato de cobre (CuSO_4) se observaron efectos inhibitorios en ambos casos. Sin embargo, las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) mostraron menos efectos inhibitorios en comparación a estos tratamientos.

El cobre en estado metálico presenta un estado de oxidación 0 (cero), y cuando entra en un ambiente oxidante, cambia su estado de oxidación, generándose las especies iónicas $\text{Cu(I)} \rightarrow \text{Cu(II)}$. Por lo tanto, se puede esperar que al agregar CuNPs al medio, las primeras especies iónicas generadas sean Cu(I) , y posteriormente, comience el proceso de oxidación a Cu(II) , uniéndose a oxígeno para formar finalmente CuO(s) . Este proceso de emisión de iones cobre sería dependiente del pH del medio (Reddy *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2019).

Además, las especies iónicas mencionadas serían capaces de generar hidróxidos e iones complejos. Por ejemplo, el ion Cu(I) puede formar el ion cobre hexahidratado ($\text{CuH}_{12}\text{O}_6^{++}$), que puede reaccionar con iones hidróxidos para formar $\text{Cu(H}_2\text{O)}_4(\text{OH})_2$, y también puede formar complejos hidroxilo en estado acuoso (Cu(OH)^+ , Cu(OH)^{3-} , y Cu(OH)_4^{2-}) e hidróxido de cobre precipitado $\text{Cu(OH)}_2(\text{s})$, sin embargo, estas especies químicas estarían condicionadas por la presencia de otros iones en el medio (Cuppett *et al.*, 2006).

En cambio, las CuONPs se presentan oxidadas y a $\text{pH} > 7$ son insolubles, pero pueden emitir iones Cu(II) de forma lenta (Wu *et al.*, 2020), mientras que las CuNPs serían más reactivas, emitiendo iones Cu(I) activamente, generando coloides o agregados junto a las formas hidróxido ya mencionadas. En ambos casos, estas nanopartículas serían capaces de emitir iones y persistir hasta su completa disolución o sulfuración en el ambiente (Kent & Vikesland, 2016).

Por lo tanto, el conjunto de complejos cuprosos formados en estas condiciones puede generar diferentes efectos biológicos, existiendo diferencias entre los grupos de tratamientos: en resumen, en los tratamientos con CuSO_4 y CuNPs, los iones Cu(I) podrían diluirse en el medio de cultivo hasta alcanzar un equilibrio, para luego oxidarse hacia Cu(II) , mientras que CuONPs generaría Cu(II) en menor medida, y en función de las condiciones del medio, podría generarse la reducción química desde Cu(II) a Cu(I) .

Los iones Cu(0) , Cu(I) , y Cu(II) poseen distintos comportamientos de transporte en las membranas celulares: ya que el ion cobre es necesario a nivel celular, el transporte de iones Cu(I) hacia el citoplasma ocurre por difusión pasiva (a favor del gradiente de concentración), mientras que los iones Cu(II) permanecen relegados al espacio extracelular y al periplasma (Ishihara *et al.*, 2020).

Los iones Cu(II) son menos reactivos que Cu(I) cuando se les compara desde un punto de vista biológico. En el espacio periplasmático pueden ser oxidados, desde Cu(I) a Cu(II), sin embargo, la presencia de radicales libres puede generar reducción. Además, el ambiente citoplasmático es reductor, reduciendo Cu(II) a Cu(I), aumentando su actividad biológica.

El cobre tiene un rol biológico importante a bajas concentraciones: tanto superóxido dismutasas como oxidasas terminales necesitan cobre como cofactor o contenido en estructuras organometálicas para conferir actividad óxido-reductora. El ion cobre es entonces adquirido por metalochaperonas periplasmáticas o cobre-reductasas citoplasmáticas que permiten su transporte (Robinson & Winge, 2010; Hernández-Montes *et al.*, 2012). Entonces, se pueden visualizar dos escenarios, uno donde ingresan los iones Cu(I) por difusión pasiva y otro donde ingresan por transportadores de Cu(II) específicos, para luego, ser reducidos a Cu(I).

Dada la importancia de la captura del ion Cu en bacterias que poseen enzimas con actividad reductora del nitrato, se han estudiado extensamente los sistemas homeostáticos, de adquisición de cobre y resistencia en bacterias consideradas patógenas (Argüello *et al.*, 2013), sin embargo, aún falta explorar los mecanismos de homeostasis de cobre en organismos nitrificantes.

Entre algunos antecedentes, se ha sugerido que otros organismos nitrificantes, como *Nitrosopumilus maritimus* necesitan de cantidades mínimas de cobre para facilitar la oxidación de amonio (Amin *et al.*, 2013), y que organismos desnitrificantes como *Paracoccus denitrificans* serían afectados por los niveles de cobre, incidiendo en la eficiencia de la enzima óxido nítrico reductasa (Woolfenden *et al.*, 2013).

En un escenario hipotético natural, *N. winogradskyi* sería desafiada a recolectar iones cobre a concentraciones bajas, por lo tanto, la difusión pasiva de iones Cu(I) y transporte de Cu(II) serían beneficiosos para este organismo, ya que es esencial para componentes de la cadena transportadora de electrones, respiración celular y durante la oxidación de nitritos (Sundermeyer-Klinger *et al.*, 1984). Por ejemplo, se ha señalado que a una concentración de 0.006 mM de CuSO₄ (1 mg L⁻¹) habría una mejora en la nitrificación, mientras que a concentraciones mayores (0.06 mM y 0.638 mM), la nitrificación se vería drásticamente afectada (VandeVoort & Arai, 2018). Estos últimos antecedentes son coherentes con los resultados presentados, ya que a una concentración de 0.04 mM, se observó una disminución drástica de la actividad metabólica. Sin embargo, por razones de limitación de esfuerzo en el rango de las concentraciones, no se realizaron ensayos a concentraciones más bajas que 0.04 mM.

Un exceso de iones cobre (tanto de Cu(I) como de Cu(II)) en el medio extracelular podría generar un aumento de la difusión de Cu(I) hacia el citoplasma, generando estrés oxidativo por formación de peróxido de hidrógeno, radicales libres y gatillando la formación del complejo ADN-oxo-cobre, que generaría ruptura de hebras de ADN e interrumpiendo procesos de transcripción y replicación (Schweigert *et al.*, 2000). En este escenario celular, para reducir los daños por estrés oxidativo, aumentaría la expresión de superóxido dismutasa Zn/Cu, catalasas y sistemas de expulsión de iones metálicos.

En los resultados se observó una disminución cercana al 95% de la actividad metabólica de *N. winogradskyi* durante la exposición a CuNPs y CuSO₄ (en diferentes niveles de tratamiento). Por lo tanto, se sugiere que el principal mecanismo de toxicidad de las nanopartículas sería a través de la emisión de iones Cu que ingresaron al citoplasma, generando toxicidad, afectando su viabilidad y actividad metabólica.

Existen antecedentes que mencionan el requerimiento de una cantidad mínima de cobre para mantener la homeostasis, asegurando la metalación de cuproproteínas y previniendo toxicidad: se realizó un modelo para simular toxicidad en *Pseudomonas aeruginosa* y se determinó que existe un umbral donde las células perderían su capacidad de controlar los niveles de cobre (Parmar *et al.*, 2018; Bhamidimarri *et al.*, 2020), sin embargo, aún se desconoce como actuarían este tipo de regulación en *N. winogradskyi*.

En el tratamiento con CuONPs, se observaron menos efectos nocivos sobre la actividad metabólica cuando es comparado a los efectos observados con CuNPs y CuSO₄. Esta diferencia se debe a que los iones Cu(II) liberados por CuONPs podrían acumularse en el espacio periplasmático y ser reducidos a Cu(I), generando daño oxidativo cuando son transportados hacia el citoplasma. Así, los resultados sugieren que, la difusión de iones y su tipo serían los principales factores que influenciarían la actividad metabólica de *N. winogradskyi*, siendo esta una posible explicación a la variación observada entre las combinaciones de tratamientos.

Los resultados de los análisis de clúster para MALDI-TOF/TOF MS sugirió que los tratamientos con CuONPs y CuNPs poseerían efectos similares sobre el patrón de expresión. La búsqueda generada en la base de datos UNIPROT mostró que la mayor parte de las proteínas detectadas no están caracterizadas, conociéndose solo algunas anotaciones funcionales, lo que dificultó inferir con certeza algún tipo de proceso biológico. Sin embargo, fue posible establecer cambios en la expresión de estas entre los tratamientos.

En el *heatmap* se aprecia que los tratamientos con CuNPs y CuONPs poseen diferentes tipos de proteínas expresadas, siendo CuONPs el tratamiento más similar al control, mientras que CuNPs es uno de los más diferentes respecto al control. Si a esto le sumamos que las IC₅₀ estimadas para CuNPs y CuONPs son de $\leq 2.5 \text{ mg L}^{-1}$ y 31.81 mg L^{-1} , se puede asociar nuevamente el efecto de la presencia de iones Cu²⁺ en disolución en el medio, sugiriendo que el estado de oxidación del cobre de las nanopartículas es capaz de generar diferentes respuestas en *N. winogradskyi*.

MALDI-TOF/TOF MS es una técnica utilizada en el *fingerprinting* y reconocimiento rápido de cepas en el área clínica, pero su uso está condicionado por la validación y caracterización de cepas establecidas anteriormente. En este caso, no existía una base de datos libre con el patrón característico para *N. winogradskyi*, ya que esta técnica no es común en microbiología ambiental. Pese a que existen investigaciones donde se ha monitoreado la respuesta a estrés bacteriano mediante MALDI-TOF/TOF MS (Hasan *et al.*, 2013), los resultados de masa/carga informados solo pueden servir para comparar entre los tratamientos, pero no son considerados como confirmatorios de la presencia de las proteínas mostradas por UNIPROT, por lo que se deben hacer indagaciones futuras.

6.2 Los fungicidas Carbendazim e Iprodiona serían menos dañinos sobre la actividad metabólica pero sus tratamientos en combinación con nanopartículas generarían efectos tóxicos.

La estimación de IC_{50} para los fungicidas Carbendazim e Iprodiona fue de >2.56 mM y 0.83 mM. Ambos fungicidas son de alto peso molecular cuando se compara con sus contrapartes derivadas y aún no están dilucidados los mecanismos moleculares detrás de la migración o traslocación a través de la membrana citoplasmática en bacterias.

Los resultados sugieren que hubo una baja sensibilidad a estos compuestos. Carbendazim posee como diana a tubulina beta, que es un componente estructural de citoesqueleto en eucariontes, pudiendo intervenir en la dinámica estructural y de adhesión celular, afectando la proliferación celular (Yenjerla *et al.*, 2009; Vela-Corcía *et al.*, 2018). En el caso de bacterias, existen proteínas homologas a tubulina-beta, sin embargo, no existe evidencia que sugiera interacción entre Carbendazim y dicha estructura.

Por otra parte, se conoce que iprodiona generaría citotoxicidad en hepatocitos, mediante inhibición de glutatión reductasa y superóxido dismutasa, induciendo una mayor sensibilidad al estrés oxidativo (Radice *et al.*, 2001; Chaufan *et al.*, 2019). Además, análisis computacionales de *docking* molecular han sugerido interacción con albumina de suero bovino, reportando la existencia de dos motivos de interacción (Ahmed *et al.*, 2019).

Sin embargo, en el caso de las bacterias, se conocen antecedentes de disminución de actividad metabólica generado por Iprodiona, sin quedar dilucidados los mecanismos de interacción ni cascadas de señalización (Yang *et al.*, 2011).

Respecto a la nitrificación, Lang & Cai (2009) reportaron que carbendazim podría considerarse seguro ya que no afectó la nitrificación a 220 mg kg^{-1} en suelo (40 veces la dosis de recomendada), mientras que otros antecedentes sostienen que 50 mg kg^{-1} (0.28 mM) son suficientes para afectar a los organismos nitrificantes del suelo (Ding *et al.*, 2019).

Así, la aparente resistencia a estos compuestos (cuando se compara con los efectos generados con cobre) podría tener su explicación en que existiría poca interacción molecular con componentes citoplasmáticos o porque no ingresan al interior debido a la barrera selectiva generada por las membranas celulares.

Cuando fue estimada la IC_{50} de carbendazim e iprodiona para *N. winogradskyi*, los resultados sugieren una mayor sensibilidad a iprodiona que a carbendazim, por lo tanto, se puede señalar también que iprodiona generaría efectos inhibitorios sobre la actividad metabólica, pero a una magnitud menor cuando se compara a los efectos de CuNPs, CuONPs y $CuSO_4$. De esta forma, se sugiere que ambas moléculas serían relativamente inocuas a las concentraciones ensayadas cuando comparamos sus efectos versus las nanopartículas de cobre.

El análisis RSH sugirió que CuNPs fue el factor significativo cuando se ensayó junto a Carbendazim, mientras que CuONPs no fue significativo (sino que Carbendazim), indicando que la presencia de Carbendazim no afectaría a la actividad metabólica de *N. winogradskyi*.

Los resultados de los ensayos con Carbendazim, sobre la actividad metabólica de *N. winogradskyi*, mostraron que no hay diferencias significativas respecto al control, sugiriendo que no generaría efectos negativos sobre la actividad metabólica. Las diferencias observadas entre los tratamientos con nanopartículas y Carbendazim, sugieren que el tipo de especie iónica generado por las nanopartículas es un factor clave para explicar la disminución de la actividad metabólica en ensayos combinados.

Además, el análisis RSH mostró que tanto CuNPs como CuONPs y CuSO₄, y no Iprodiona fueron los factores que influenciaron la disminución de la actividad metabólica en los ensayos combinados. El análisis de aditividad de Loewe sugirió que, durante las combinaciones, los efectos serían aditivos y ejercidos fundamentalmente por CuNPs y CuSO₄ por sí solos, y no por la interacción con este fungicida.

En el caso de CuONPs y Carbendazim, el análisis RSH sugirió que el efecto sería principalmente ejercido por Carbendazim, y el análisis de aditividad de Loewe sugiere efectos aditivos. La aditividad detectada sugiere que el efecto observado en las combinaciones se debe a las nanopartículas y no por un efecto sinérgico de ambos compuestos.

Por lo tanto, se puede postular que el ion cobre (Cu(I) y Cu(II)) serían los principales responsables de la inhibición de la actividad metabólica en los ensayos de combinación. Recordando lo mencionado en la sección anterior, los iones Cu(I) poseen un diámetro menor que las moléculas de fungicidas y, además, debido a su carácter iónico, pueden entrar al citoplasma con mayor facilidad, ejerciendo su efecto tóxico. Mientras que las moléculas de fungicidas no serían capaces de entrar al citoplasma, quedando restringidas al espacio extracelular o espacio periplasmático. Sin embargo, solo se puede especular ya que se necesita mayor información sobre el comportamiento de este tipo de fungicidas, escaseando la literatura donde se menciona la traslocación de este tipo de moléculas en bacterias.

En el análisis de aditividad, destaca la detección de antagonismo entre iprodiona y CuNPs a una concentración de 0.04 mM + 2.5 mg L⁻¹; en este caso se sugiere que la actividad metabólica observada es mayor a la predicha por el modelo nulo de Loewe, sugiriendo que, a esta concentración, iprodiona y CuNPs tendrían algún tipo de interacción química, sin embargo, existen pocos antecedentes para confirmar esto.

El análisis de comparación por pares de PERMANOVA de perfiles MALDI-TOF/TOF MS, mostró que solo la respuesta a carbendazim sería significativamente diferente respecto al control. Sin embargo, el análisis de detección de proteínas en UNIPROT mostró una diversidad de proteínas compartidas entre los diferentes tratamientos. Esto sugiere que, pese a que los análisis estadísticos sugieren que los tratamientos poseerían similitudes, existen diferencias por presencia o ausencia de proteínas como respuesta.

Finalmente, existen antecedentes que avalan la interacción entre el ion Cu(II) y carbendazim, donde se ha sugerido que Cu(II) sería capaz de alterar la respuesta electroquímica de carbendazim (afinidad), sugiriendo una alteración en la dinámica de mineralización de este (Da Silva Santos *et al.*, 2020), por lo tanto, existiría algún tipo de interacción química entre estos dos compuestos, siendo esta una posible explicación al comportamiento observado sobre *N. winogradskyi*.

6.3 Los productos de biodegradación de plaguicidas generarían mayor toxicidad que los plaguicidas, junto a CuNPs generan efectos inhibitorios sobre la actividad metabólica de *N. winogradskyi*.

Se observó que existe una disminución de la actividad en los tratamientos combinados con productos de biodegradación y nanopartículas en comparación con los tratamientos solo con productos de biodegradación. Cuando son comparados los niveles de actividad metabólica, se puede apreciar que los productos de biodegradación, generalmente, indujeron un nivel de inhibición diferente al observado en los tratamientos con fungicidas. Esto podría deberse a que estas moléculas son más pequeñas que sus contrapartes plaguicidas, teniendo más posibilidad de entrar al citoplasma, afinidad a membranas celulares o permanecer por un mayor tiempo en el espacio periplasmático de bacterias.

En microorganismos, se ha señalado que 3,5-dicloroanilina ejerce efectos adversos sobre la nitrificación en *Nitrosospira multiformis* a una concentración de 0.03 mM, a diferencia de Iprodiona, donde a una concentración de 0.3 mM no generó efectos adversos (Vasileiadis *et al.*, 2018). Similarmente, se ha documentado que catecol y otros compuestos similares poseen actividad antimicrobiana (Kocaçalışkan *et al.*, 2006). Otros antecedentes señalan que a una concentración de 0.192 mM de catecol se generaría una disminución cercana al 70% de la nitrificación (Suárez-Ojeda *et al.*, 2010). Por otra parte, desde un punto de vista toxicológico, se conoce que los fenoles halogenados (como 2,4-diclorofenol) también son capaces de disminuir la respiración celular en mitocondrias (Izushi *et al.*, 1988).

En nuestros resultados, el análisis RSH sugirió que en los tratamientos de combinación CuNPs + 3,5-dicloroanilina y CuNPs + 2,4-diclorofenol, ambos factores serían significativos, mientras que el tratamiento CuNPs + Catecol, solo CuNPs y la mezcla de ambos compuestos (interacción) sería significativa.

Así, pueden ser visualizados escenarios donde 3,5-dicloroanilina sería capaz de interferir con la cadena transportadora de electrones de *N. winogradskyi*, generando una disminución de la actividad metabólica, sin embargo, no existen antecedentes que confirmen esta interacción. Por lo tanto, se puede especular que, en un escenario de combinación de 3,5-dicloroanilina junto a CuNPs, los iones Cu(I) generados por las nanopartículas ingresarían al citoplasma, generando estrés oxidativo, mientras que 3,5-dicloroanilina generaría interferencia en la cadena transportadora de electrones, siendo estos efectos los responsables de la disminución de la actividad metabólica observada.

En el caso de 2,4-diclorofenol y CuNPs, se conoce que los fenoles halogenados reducen la tasa de respiración celular en hepatocitos de rata (Izushi *et al.*, 1988), e interfieren en la cadena transportadora de electrones, inhibiendo el complejo citocromo bc1 en mitocondrias (Tokutake *et al.*, 1991), y también pueden ejercer cambios en la permeabilidad de membrana en microorganismos, conduciendo a fugas de K⁺ y ATP hacia el espacio extracelular (Heipieper *et al.*, 1991). En otro ensayo, se detectó que la IC₅₀ estimada para 2,4-diclorofenol en *Bacillus subtilis* TL81 fue de 75 ppm (0.46 mM) (Liu *et al.*, 1982).

Dado estos antecedentes, se puede sugerir que el estrés generado en los ensayos combinados generaría efectos de fugas de electrolitos y ATP, así como estrés oxidativo por presencia de iones Cu(I) en el citoplasma.

En el caso de la mezcla catecol + CuNPs, se conoce que el catecol puede influir la viabilidad de microorganismos, y debido a su carácter lipofílico, sería más afín a incorporarse en la membrana plasmática.

En el modelo de aditividad de Loewe, el análisis sugirió que catecol y CuNPs podrían generar un efecto sinérgico: en este escenario, la adición de catecol e iones Cu (II) generaría semiquinona + Cu(I) (Schweigert *et al.*, 2000). Si se considera que las células intentarían compensar el exceso de Cu(I) oxidando y expulsando cobre a la forma de Cu (II) al espacio periplasmático, la presencia de catecol generaría un ciclo de reducción que retrasaría la oxidación del ion cobre, presentándose entonces la forma más tóxica durante mayor tiempo.

Esta dinámica de producción de Cu(I) en presencia de catecol gatillaría también un aumento de la generación de peróxido de hidrógeno, iones hidroxilo y radicales, conduciendo a daño oxidativo. Además de la formación de ADN-oxo-cobre (Schweigert *et al.*, 2000), la *o*-benzoquinona generada desde la reacción de reducción de Cu(II) a Cu(I) puede interferir con los puentes disulfuro de algunas proteínas, conduciendo a fallas en el plegamiento, alterando funciones enzimáticas (Schweigert *et al.*, 2001).

Esta podría ser una explicación a la detección estadística del sinergismo a una concentración de $2.5 \text{ mg L}^{-1} + 0.04 \text{ mM}$ de CuNPs + Catecol, sin embargo, este fenómeno no fue observado a concentraciones más altas, donde tentativamente, otros factores vinculados al equilibrio químico de especiación podrían afectar el sinergismo.



6.4 Sensibilidad de *Nitrobacter*: síntesis de los efectos observados.

Se conoce que los organismos nitrificantes son vulnerables a agentes tóxicos de origen antrópico, tanto orgánicos (Kim *et al.*, 2008), como metálicos (Juliastuti *et al.*, 2003a), y que la oxidación de nitritos de *N. winogradskyi* es termodinámicamente desfavorable, siendo su crecimiento quimiolitotrófico lento en comparación a otros microorganismos (Maia & Moura, 2014). Esto haría particularmente vulnerable a *N. winogradskyi*, ya que tendría una baja capacidad de adaptación.

Los resultados mostraron que la toxicidad generada por Cu(I) proveniente desde nanopartículas de cobre en disolución, sería un agente dañino para *N. winogradskyi*, sugiriendo que las nanopartículas podrían ser dañinas para la nitrificación en el rango de concentraciones ensayadas. Los resultados de los análisis sugirieron que la combinación de nanopartículas y plaguicidas ensayados generan efectos aditivos, principalmente atribuidos a las nanopartículas de cobre.

De esta forma, se pueden visualizar escenarios donde las nanopartículas de cobre generarían efectos nocivos sobre la nitrificación, dañando suelos agrícolas, pero estos efectos serían mayormente atribuidos a la presencia de nanopartículas y no a plaguicidas. Además, se puede sugerir que la presencia de derivados biodegradativos de plaguicidas (y no necesariamente de plaguicidas) podría afectar la nitrificación.

Los resultados también sugieren que, durante la aplicación de nanopartículas de cobre en suelos agrícolas con presencia de productos biodegradativos de plaguicidas, existiría un mayor riesgo de daño de los procesos de nitrificación, impactando en la nutrición vegetal de los cultivos. Ya se ha reportado que los metales pesados pueden interferir e inhibir los procesos de biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos en suelos (Sandrin & Maier, 2003), en escenarios definidos como fenómenos de co-contaminación. Sin embargo, los estudios de co-contaminación entre plaguicidas y nanopartículas aún son escasos (Deng *et al.*, 2017).

Algunas de las dificultades para el estudio de nanopartículas metálicas en suelos es su reactividad, que es dependiente tanto del tipo de metal que la conforma, del suelo y de los tipos de interacciones biológicas (Ma *et al.*, 2018). De este modo, el estudio de la nitrificación en suelos podría verse influenciado por un sinnúmero de variables que afectarían el resultado de los experimentos. Por ejemplo, se ha documentado que la presencia de nanopartículas de cobre puede aumentar la persistencia de atrazina en suelo (Parada *et al.*, 2019). Es por esto que el estudio de la aplicación de nanopartículas metálicas sobre cultivos axénicos de organismos nitrificantes sería ventajoso desde un punto de vista práctico, no obstante, aumentaría la probabilidad de discrepancia respecto a resultados de estudios de aplicación de nanopartículas en suelos y nitrificación.

Se espera que a futuro se exploren distintas combinaciones de nanopartículas metálicas y plaguicidas bajo diferentes condiciones edáficas o a otros microorganismos de relevancia en agricultura que estén involucrados en procesos biogeoquímicos, sostenidas también junto a modelos matemáticos que permitan evaluar efectos multifactoriales.

CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos y los antecedentes señalados, se puede concluir que la asociación entre nanopartículas de cobre y plaguicidas generan efectos negativos sobre la actividad metabólica de *N. winogradskyi*. Estos efectos serían de tipo aditivo, y no sinérgicos, y atribuidos principalmente a la reactividad de las nanopartículas de cobre metálico (CuNPs) y de óxido de cobre (CuONPs).

Otras conclusiones que destacan también son:

- Las nanopartículas de cobre y sulfato de cobre generan similares efectos sobre la actividad metabólica de *N. winogradskyi*, sin embargo, las nanopartículas de óxido de cobre serían menos tóxicas que las nanopartículas de cobre.
- El estado de oxidación del cobre sería el principal responsable para definir los efectos sobre la actividad metabólica de *N. winogradskyi*.
- Iprodiona, Carbendazim y 2,4-D no generan los niveles de toxicidad observados durante la exposición a nanopartículas de cobre, mientras que la combinación de plaguicidas + nanopartículas de cobre generaría efectos aditivos atribuidos a la toxicidad de las nanopartículas.
- 3,5-dicloroanilina, catecol y 2,4-diclorofenol generan niveles de toxicidad superiores a los de los plaguicidas iprodiona, carbendazim y 2,4-D, pero inferiores a los de las nanopartículas de cobre.
- La combinación de nanopartículas de cobre y derivados de plaguicidas genera efectos aditivos atribuidos a la toxicidad de las nanopartículas.
- La combinación de catecol y nanopartículas de cobre puede generar efectos sinérgicos negativos a una concentración de 0.04 mM.
- Los análisis estadísticos SRH, aditividad de Loewe, y HSA sugirieron efectos principalmente aditivos entre nanopartículas de cobre y plaguicidas.
- El análisis MALDI TOF/TOF MS mostró perfiles proteicos similares entre tratamientos, el análisis PERMANOVA mostró que solo el tratamiento con carbendazim posee diferencias significativas respecto al control.
- La búsqueda de proteínas por peso molecular en la base de datos de UNIPROT para el organismo *N. winogradskyi* mostró que, si bien existen diferencias entre tratamientos, las proteínas detectadas no están debidamente caracterizadas en las bases de datos disponibles.

PROYECCIONES

Actualmente el uso de nanopartículas metálicas y nanomateriales va en aumento, y sus efectos biológicos, tiempos de persistencia y efectos sobre suelo aún no están caracterizados, por lo que se recomienda que su uso para fines comerciales sea limitado y supervigilado por instituciones gubernamentales.

Debido a los desafíos de explotación agrícola a futuro, se proyecta la necesidad de más análisis de suelos para la detección de derivados de productos químicos plaguicidas, tales como fenoles clorados, catecoles, benzoquinonas o anilinas cloradas, ya que la estimación de sus cargas podría ayudar a reducir un potencial efecto sinérgico disruptor sobre la nitrificación.

Tomando en cuenta que las nanopartículas de cobre serían uno de los principales agentes tóxicos sobre la nitrificación, se puede sugerir que deben realizarse estudios de suelo apropiados antes de la aplicación de nanopartículas de cobre, ya que podrían afectar la proporción de amonio/nitrato en el suelo, conduciendo a daños sobre los cultivos y su rendimiento.

Finalmente, los resultados de este estudio podrían contribuir antecedentes respecto a la vigilancia de la aplicación de nanopartículas, ya que aún no existe una regulación internacional clara sobre su uso, estando su clasificación abierta al debate científico-técnico. Se proyecta que, en un futuro cercano, comience la formación de sistemas de regulación y control de uso de nanopartículas, de forma similar a lo ocurre con IRAC en la clasificación y uso de plaguicidas.



REFERENCIAS

1. **Adler**, D., Murdoch, D. & others (2020). rgl: 3D Visualization Using OpenGL. R package version 0.103.5. <https://CRAN.R-project.org/package=rgl>
2. **Agarwal**, H., Nakara, A., & Shanmugam, V. K. (2019). Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2561–2572. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.116>
3. **Aguiar**, L. M., dos Santos, J. B., Barroso, G. M., Laia, M. L. de, Gonçalves, J. F., da Costa, V. A. M., & Brito, L. A. (2020). Influence of 2,4-D residues on the soil microbial community and growth of tree species. *International Journal of Phytoremediation*, 22(1), 69–77. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1644289>
4. **Ahmed**, A., Shamsi, A., Khan, M. S., Husain, F. M., & Bano, B. (2019). Probing the interaction of human serum albumin with iprodione, a fungicide: spectroscopic and molecular docking insight. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(4), 857–862. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1442252>
5. **Alfaro**, M., Salazar, F., Hube, S., Ramírez, L., & Mora, M. S. (2018). Ammonia and nitrous oxide emissions as affected by nitrification and urease inhibitors. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 18(2), 479–486. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162018005001501>
6. **Amberger**, A. (1986). Potentials of nitrification inhibitors in modern N-fertilizer management. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, 149(4), 469–484. <https://doi.org/10.1002/jpln.19861490410>
7. **Amin**, S. A., Moffett, J. W., Martens-Habbena, W., Jacquot, J. E., Han, Y., Devol, A., ... Armbrust, E. V. (2013). Copper requirements of the ammonia-oxidizing archaeon *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 and implications for nitrification in the marine environment. *Limnology and Oceanography*, 58(6), 2037–2045. <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.6.2037>
8. **Andersen**, J. H., Fossing, H., Hansen, J. W., Manscher, O. H., Murray, C., & Petersen, D. L. J. (2014). Nitrogen Inputs from Agriculture: Towards Better Assessments of Eutrophication Status in Marine Waters. *AMBIO*, 43(7), 906–913. <https://doi.org/10.1007/s13280-014-0514-y>
9. **Anderson**, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (pp. 1–15). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
10. **Andri et mult. al. S** (2021). DescTools: Tools for Descriptive Statistics. R package version 0.99.41, <https://cran.r-project.org/package=DescTools>.
11. **Arciero**, D. M., Pierce, B. S., Hendrich, M. P., & Hooper, A. B. (2002). Nitrosocyanin, a Red Cupredoxin-like Protein from *Nitrosomonas europaea* †. *Biochemistry*, 41(6), 1703–1709. <https://doi.org/10.1021/bi015908w>
12. **Arenas-Lago**, D., Abdolapur Monikh, F., Vijver, M. G., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2019). Dissolution and aggregation kinetics of zero valent copper nanoparticles in (simulated) natural surface waters: Simultaneous effects of pH, NOM and ionic strength. *Chemosphere*, 226, 841–850. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.190>
13. **Argüello**, J. M., Raimunda, D., & Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00073>
14. **Arp**, D. J., & Bottomley, P. J. (2006). Nitrifiers: more than 100 years from isolation to genome sequences. *Microbe-American Society for Microbiology*, 1(5), 229.

15. **Athiel, P.**, Alfizar, Mercadier, C., Vega, D., Bastide, J., Davet, P., ... Cleyet-Marel, J. C. (1995). Degradation of iprodione by a soil *Arthrobacter*-like strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3216–3220. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.9.3216-3220.1995>
16. **Auguie, B.** (2017). gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics. R package version 2.3. <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>
17. **Baćmaga, M.**, Wyszowska, J., Kucharski, J., & Kaczyński, P. (2018). Changes in microbiological properties of soil during fungicide degradation. *Soil Science Annual*, 69(3), 169–176. <https://doi.org/10.2478/ssa-2018-0017>
18. **Bancroft, K.**, Grant, I. F., & Alexander, M. (1979). Toxicity of NO(2): Effect of Nitrite on Microbial Activity in an Acid Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(5), 940–944. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16345466>
19. **Barak, P.**, Jobe, B. O., Krueger, A. R., Peterson, L. A., & Laird, D. A. (1997). Effects of long-term soil acidification due to nitrogen fertilizer inputs in Wisconsin. *Plant and Soil*, 197(1), 61–69. <https://doi.org/10.1023/A:1004297607070>
20. **Barnes, H.H** & Ishimaru, C. A. (1999). Purification of catechol siderophores by boronate affinity chromatography: Identification of chrysobactin from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *BioMetals*, 12(1). <https://doi.org/10.1023/a:1009223615607>
21. **Bart, S.**, Pelosi, C., Barraud, A., Péry, A. R. R., Cheviron, N., Grondin, V., ... Crouzet, O. (2019). Earthworms Mitigate Pesticide Effects on Soil Microbial Activities. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01535>
22. **Beffa, R.**, Menne, H., & Köcher, H. (2019). Herbicide Resistance Action Committee (HRAC): Herbicide Classification, Resistance Evolution, Survey, and Resistance Mitigation Activities. In *Modern Crop Protection Compounds* (pp. 5–32). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527699261.ch1>
23. **Bending, G. D.**, Rodríguez-Cruz, M. S., & Lincoln, S. D. (2007). Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere*, 69(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.042>
24. **Ben-Moshe, T.**, Frenk, S., Dror, I., Minz, D., & Berkowitz, B. (2013). Effects of metal oxide nanoparticles on soil properties. *Chemosphere*, 90(2), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.018>
25. **Berenbaum, M. C.** (1989). What is synergy? *Pharmacological Reviews*, 41(2), 93–141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2692037>
26. **Bhamidimarri, S. P.**, Young, T., Shanmugam, M., Soderholm, S., Baslé, A., Bumann, D., & van den Berg, B. (2020). Acquisition of ionic copper by a bacterial outer membrane protein. <https://doi.org/10.1101/2020.06.04.134395>
27. **Bi, Q.-F.**, Chen, Q.-H., Yang, X.-R., Li, H., Zheng, B.-X., Zhou, W.-W., Lin, X.-Y. (2017). Effects of combined application of nitrogen fertilizer and biochar on the nitrification and ammonia oxidizers in an intensive vegetable soil. *AMB Express*, 7(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0498-7>
28. **Bock, E.**, & Wagner, M. (2006). Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. In *The Prokaryotes* (pp. 457–495). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_16
29. **Boddicker, A. M.**, & Mosier, A. C. (2018). Genomic profiling of four cultivated Candidatus *Nitrotoga* spp. predicts broad metabolic potential and environmental distribution. *The ISME Journal*, 12(12), 2864–2882. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0240-8>

30. **Bouwman**, A. F., Van Drecht, G., & van der Hoek, K. W. (2005). Surface N balances and reactive N loss to the environment from global intensive agricultural production systems for the period 1970–2030. *Science in China Series C: Life Sciences*, 48(S2), 767–779. <https://doi.org/10.1007/BF03187117>
31. **Bouwman**, L., Goldewijk, K. K., Van Der Hoek, K. W., Beusen, A. H. W., Van Vuuren, D. P., Willems, J., ... Stehfest, E. (2013). Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900-2050 period. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 20882–20887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012878108>
32. **Božik**, M., Cejnar, P., Šašková, M., Nový, P., Maršík, P., & Klouček, P. (2018). Stress response of *Escherichia coli* to essential oil components – insights on low-molecular-weight proteins from MALDI-TOF. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31255-2>
33. **Bramhanwade**, K., Shende, S., Bonde, S., Gade, A., & Rai, M. (2016). Fungicidal activity of Cu nanoparticles against *Fusarium* causing crop diseases. *Environmental Chemistry Letters*, 14(2), 229–235.
34. **Briceño**, G., Lamilla, C., Leiva, B., Levio, M., Donoso-Piñol, P., Schalchli, H., ... Diez, M. C. (2020). Pesticide-tolerant bacteria isolated from a biopurification system to remove commonly used pesticides to protect water resources. *PLOS ONE*, 15(6), e0234865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234865>
35. **Britto**, D. T., & Kronzucker, H. J. (2002). NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159(6), 567–584. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-0774>
36. **Broadbent**, F. E., Tyler, K. B., & Hill, G. N. (1957). Nitrification of ammoniacal fertilizers in some California soils. *Hilgardia*, 27(9), 247–267. <https://doi.org/10.3733/hilg.v27n09p247>
37. **Brucker-Davis**, F. (2009). Effects of Environmental Synthetic Chemicals on Thyroid Function. *Thyroid*, 8(9), 827–856. <https://doi.org/10.1089/thy.1998.8.827>
38. **Budimir**, M., Plesničar, M., & Kljajić, R. (1976). Effects of the herbicide 2,4-DB and fungicide captan on reactions of mitochondria and chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 4(1), 166–174. <https://doi.org/10.1007/BF02221021>
39. **Bundy**, L. G., & Bremner, J. M. (1973). Inhibition of Nitrification in Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 37(3), 396–398. <https://doi.org/10.2136/sssaj1973.03615995003700030025x>
40. **Bundy**, L. G., & Bremner, J. M. (1974). Effects of urease inhibitors on nitrification in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 6(1), 27–30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(74\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(74)90007-8)
41. **Bussink**, D. W., & Oenema, O. (1998). Ammonia volatilization from dairy farming systems in temperate areas: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51(1), 19–33. <https://doi.org/10.1023/A:1009747109538>
42. **Calabrese**, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21(2), 91–97. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht217oa>
43. **Campbell**, M. A., Chain, P. S. G., Dang, H., El Sheikh, A. F., Norton, J. M., Ward, N. L., ... Klotz, M. G. (2011). *Nitrosococcus watsonii* sp. nov., a new species of marine obligate ammonia-oxidizing bacteria that is not omnipresent in the world's oceans: calls to validate the names '*Nitrosococcus halophilus*' and '*Nitrosomonas mobilis*.' *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 39–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01027.x>

44. **Campos**, M., Perruchon, C., Karas, P. A., Karavasilis, D., Diez, M. C., & Karpouzas, D. G. (2017). Bioaugmentation and rhizosphere-assisted biodegradation as strategies for optimization of the dissipation capacity of biobeds. *Journal of Environmental Management*, 187, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.031>
45. **Cantarella**, H., Otto, R., Soares, J. R., & Silva, A. G. de B. (2018). Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. *Journal of Advanced Research*, 13, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.008>
46. **Carlisle**, S., & Trevors, J. (1986). Effect of the herbicide glyphosate on nitrification, denitrification, and acetylene reduction in soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 29(2). <https://doi.org/10.1007/BF00208408>
47. **Carneiro**, L. S., Martínez, L. C., Gonçalves, W. G., Santana, L. M., & Serrão, J. E. (2020). The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 109991. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>
48. **Carvalho**, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
49. **Cébron**, A., & Garnier, J. (2005). *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research*, 39(20), 4979–4992. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.006>
50. **Çeçen**, F., Semerci, N., & Geyik, A. G. (2009). Inhibitory effects of Cu, Zn, Ni and Co on nitrification and relevance of speciation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jctb.2321>
51. **Cela**, S., & Sumner, M. E. (2002). Critical concentrations of copper, nickel, lead, and cadmium in soils based on nitrification. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33(1–2), 19–30. <https://doi.org/10.1081/CSS-120002374>
52. **Chandran**, K., & Love, N. G. (2008). Physiological State, Growth Mode, and Oxidative Stress Play a Role in Cd(II)-Mediated Inhibition of *Nitrosomonas europaea* 19718. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2447–2453. <https://doi.org/10.1128/AEM.01940-07>
53. **Chatterjee**, A. K., Chakraborty, R., & Basu, T. (2014). Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*, 25(13), 135101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/13/135101>
54. **Chaufan**, G., Galvano, C., Nieves, M., Mudry, M. D., Ríos de Molina, M. del C., & Andrioli, N. B. (2019). Oxidative Response and Micronucleus Centromere Assay in HEP-2 Cells Exposed to Fungicide Iprodione. *Chemical Research in Toxicology*, 32(4), 745–752. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00405>
55. **Chavali**, M. S., & Nikolova, M. P. (2019). Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology. *SN Applied Sciences*, 1(6), 607. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0592-3>
56. **Chen**, H. (2018). Metal based nanoparticles in agricultural system: behavior, transport, and interaction with plants. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 30(1), 123–134. <https://doi.org/10.1080/09542299.2018.1520050>
57. **Chen**, Y. X., Lin, Q., He, Y. F., & Tian, G. M. (2004). Behavior of Cu and Zn under combined pollution of 2,4-dichlorophenol in the planted soil. *Plant and Soil*, 261(1/2), 127–134. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035581.92021.f2>
58. **Chen**, Y., Wang, D., Zhu, X., Zheng, X., & Feng, L. (2012). Long-Term Effects of Copper Nanoparticles on Wastewater Biological Nutrient Removal and N₂O Generation in the Activated Sludge Process. *Environmental Science & Technology*, 46(22), 12452–12458. <https://doi.org/10.1021/es302646q>

59. **Chiaia-Hernandez**, A. C., Keller, A., Wächter, D., Steinlin, C., Camenzuli, L., Hollender, J., & Krauss, M. (2017). Long-Term Persistence of Pesticides and TPs in Archived Agricultural Soil Samples and Comparison with Pesticide Application. *Environmental Science & Technology*, 51(18), 10642–10651. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02529>
60. **Choi**, O. K., & Hu, Z. Q. (2009). Nitrification inhibition by silver nanoparticles. *Water Science and Technology*, 59(9), 1699–1702. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.205>
61. **Chu**, Y., Wang, X., Xue, N., & Wang, Y. (2016). Properties of CuO nanoparticles–humic acid (CuONP–HA) flocs and subsequent effect on membrane fouling: Influence of aluminum species and solution pH. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 788–796. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.11.043>
62. **Ciji**, A., & Akhtar, M. S. (2020). Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 878–908. <https://doi.org/10.1111/raq.12354>
63. **Cioffi**, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., ... Traversa, E. (2005). Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chemistry of Materials*, 17(21), 5255–5262. <https://doi.org/10.1021/cm0505244>
64. **Clar**, J. G., Li, X., Impellitteri, C. A., Bennett-Stamper, C., & Luxton, T. P. (2016). Copper Nanoparticle Induced Cytotoxicity to Nitrifying Bacteria in Wastewater Treatment: A Mechanistic Copper Speciation Study by X-ray Absorption Spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 9105–9113.
65. **Cleemput**, O., & Samater, A. H. (1995). Nitrite in soils: accumulation and role in the formation of gaseous N compounds. *Fertilizer Research*, 45(1), 81–89. <https://doi.org/10.1007/BF00749884>
66. **Collins**, D., Luxton, T., Kumar, N., Shah, S., Walker, V. K., & Shah, V. (2012). Assessing the Impact of Copper and Zinc Oxide Nanoparticles on Soil: A Field Study. *PLoS ONE*, 7(8), e42663.
67. **Commandeur**, L. C. M., & Parsons, J. R. (1990). Degradation of halogenated aromatic compounds. *Biodegradation*, 1(2–3), 207–220. <https://doi.org/10.1007/BF00058837>
68. **Conway**, J. R., Adeleye, A. S., Gardea-Torresdey, J., & Keller, A. A. (2015). Aggregation, Dissolution, and Transformation of Copper Nanoparticles in Natural Waters. *Environmental Science & Technology*, 49(5), 2749–2756. <https://doi.org/10.1021/es504918q>
69. **Corke**, C. T., & Thompson, F. R. (1970). Effects of some phenylamide herbicides and their degradation products on soil nitrification. *Canadian Journal of Microbiology*, 16(7), 567–571. <https://doi.org/10.1139/m70-095>
70. **Coskun**, D., Britto, D. T., Shi, W., & Kronzucker, H. J. (2017). Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature Plants*, 3(6), 17074. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.74>
71. **Cuppett**, J. D. Duncan, S. E., & Dietrich, A. M. (2006). Evaluation of Copper Speciation and Water Quality Factors That Affect Aqueous Copper Tasting Response. *Chemical Senses*, 31(7), 689–697. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjl010>
72. **Curran**, W. S. (2016). Persistence of herbicides in soil. *Crops & Soils*, 49(5), 16–21. <https://doi.org/10.2134/cs2016-49-0504>
73. **Cycoń**, M., Wójcik, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2011). Biodegradation kinetics of the benzimidazole fungicide thiophanate-methyl by bacteria isolated from loamy sand soil. *Biodegradation*, 22(3), 573–583. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9430-4>

74. **Da Silva Santos**, A., Simões, F. R., Codognoto, L., & Valle, E. M. A. (2020). Study of the interaction Cu(II) - Carbendazim in natural waters by electrochemical techniques. *Chemosphere*, 255, 127013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127013>
75. **Daims**, H., Lückner, S., & Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
76. **De Peretti**, A. I. F., De Moro, G. B. M., Ghittoni, N. E., De Duffard, A. M. E., & Duffard, R. O. (1987). Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on *Rhizobium* sp. in pure culture. *Environmental Toxicology & Water Quality*, 2(2), 217–228. <https://doi.org/10.1002/tox.2540020209>
77. **Degrange**, V., Lensi, R., & Bardin, R. (1997). Activity, size and structure of a *Nitrobacter* community as affected by organic carbon and nitrite in sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 24(2), 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00433.x>
78. **Demangeat**, E., Pédrot, M., Dia, A., Bouhnik-le-Coz, M., Grasset, F., Hanna, K., ... Cabello-Hurtado, F. (2018). Colloidal and chemical stabilities of iron oxide nanoparticles in aqueous solutions: the interplay of structural, chemical and environmental drivers. *Environmental Science: Nano*, 5(4), 992–1001. <https://doi.org/10.1039/C7EN01159H>
79. **Deng**, R., Lin, D., Zhu, L., Majumdar, S., White, J. C., Gardea-Torresdey, J. L., & Xing, B. (2017). Nanoparticle interactions with co-existing contaminants: joint toxicity, bioaccumulation and risk. *Nanotoxicology*, 11(5), 591–612. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1343404>
80. **Deni**, J., & Penninckx, M. J. (1999). Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4008–4013. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473409>
81. **Devol**, A. H. (2015). Denitrification, Anammox, and N₂ Production in Marine Sediments. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 403–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135040>
82. **Di**, H. J., & Cameron, K. C. (2012). How does the application of different nitrification inhibitors affect nitrous oxide emissions and nitrate leaching from cow urine in grazed pastures? *Soil Use and Management*, 28(1), 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2011.00373.x>
83. **Di**, H. J., & Cameron, K. C. (2016). Inhibition of nitrification to mitigate nitrate leaching and nitrous oxide emissions in grazed grassland: a review. *Journal of Soils and Sediments*, 16(5), 1401–1420. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1403-8>
84. **Ding**, B., Schmeling, S., & Fuchs, G. (2008). Anaerobic Metabolism of Catechol by the Denitrifying Bacterium *Thauera aromatica*—a Result of Promiscuous Enzymes and Regulators? *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1620–1630. <https://doi.org/10.1128/JB.01221-07>
85. **Ding**, H., Zheng, X., Zhang, J., Zhang, Y., Yu, J., & Chen, D. (2019). Influence of chlorothalonil and carbendazim fungicides on the transformation processes of urea nitrogen and related microbial populations in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(30), 31133–31141. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06213-8>
86. **Dodder**, N. (2017). *OrgMassSpecR: Organic Mass Spectrometry*. R package version 0.5-3. <https://CRAN.R-project.org/package=OrgMassSpecR>
87. **Dokianakis**, S. N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2006). Impact of five selected xenobiotics on isolated ammonium oxidizers and on nitrifying activated sludge. *Environmental Toxicology*, 21(4), 310–316. <https://doi.org/10.1002/tox.20199>

88. **Dougherty**, W. J., Collins, D., Van Zwielen, L., & Rowlings, D. W. (2016). Nitrification (DMPP) and urease (NBPT) inhibitors had no effect on pasture yield, nitrous oxide emissions, or nitrate leaching under irrigation in a hot-dry climate. *Soil Research*, 54(5), 675. <https://doi.org/10.1071/SR15330>
89. **Dubey**, H. D., & Rodriguez, R. L. (1970). Effect of Dyrene and Maneb on Nitrification and Ammonification, and Their Degradation in Tropical Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 34(3), 435–439. <https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400030025x>
90. **Durand**, P., Martin, G., Blondet, A., Gilleron, J., Carette, D., Janczarski, S., ... Perrard, M.-H. (2017). Effects of low doses of carbendazim or iprodione either separately or in mixture on the pubertal rat seminiferous epithelium: An ex vivo study. *Toxicology in Vitro*, 45, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.022>
91. **EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)**. (2016). Revision of the currently authorized maximum copper content in complete feed. *EFSA Journal*, 14(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4563>
92. **Eixenberger**, J. E., Anders, C. B., Hermann, R. J., Brown, R. J., Reddy, K. M., Punnoose, A., & Wingett, D. G. (2017). Rapid Dissolution of ZnO Nanoparticles Induced by Biological Buffers Significantly Impacts Cytotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 30(8), 1641–1651. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00136>
93. **El Hadri**, H., Louie, S. M., & Hackley, V. A. (2018). Assessing the interactions of metal nanoparticles in soil and sediment matrices – a quantitative analytical multi-technique approach. *Environmental Science: Nano*, 5(1), 203–214. <https://doi.org/10.1039/C7EN00868F>
94. **El-Ramady**, H., Abdalla, N., Alshaal, T., El-Henawy, A., Elmahrouk, M., Bayoumi, Y., ... Schnug, E. (2018). Plant Nano-nutrition: Perspectives and Challenges (pp. 129–161). https://doi.org/10.1007/978-3-319-70166-0_4
95. **El-Ramady**, H., Abdalla, N., Taha, H. S., Alshaal, T., El-Henawy, A., Faizy, S. E.-D. A., ... Schnug, E. (2016). Selenium and nano-selenium in plant nutrition. *Environmental Chemistry Letters*, 14(1), 123–147. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0535-1>
96. **Engates**, K. E., & Shipley, H. J. (2011). Adsorption of Pb, Cd, Cu, Zn, and Ni to titanium dioxide nanoparticles: effect of particle size, solid concentration, and exhaustion. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(3), 386–395. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0382-3>
97. **Enrich-Prast**, A. (2006). Effect of pesticides on nitrification in aquatic sediment. *Brazilian Journal of Biology*, 66(2a), 405–412. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842006000300004>
98. **Fang**, H., Wang, Y., Gao, C., Yan, H., Dong, B., & Yu, Y. (2010). Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim. *Biodegradation*, 21(6), 939–946. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9353-0>
99. **Feld**, L., Hjelmsø, M. H., Nielsen, M. S., Jacobsen, A. D., Rønn, R., Ekelund, F., ... Jacobsen, C. S. (2015). Pesticide Side Effects in an Agricultural Soil Ecosystem as Measured by *amoA* Expression Quantification and Bacterial Diversity Changes. *PLOS ONE*, 10(5), e0126080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126080>
100. **Fernandes**, J. P., Almeida, C. M. R., Andreotti, F., Barros, L., Almeida, T., & Mucha, A. P. (2017). Response of microbial communities colonizing salt marsh plants rhizosphere to copper oxide nanoparticles contamination and its implications for phytoremediation processes. *Science of The Total Environment*, 581–582, 801–810.
101. **Fernandez-Fontaina**, E., Carballa, M., Omil, F., & Lema, J. M. (2014). Modelling cometabolic biotransformation of organic micropollutants in nitrifying reactors. *Water Research*, 65, 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.048>

102. **Fillinger**, S., Ajouz, S., Nicot, P. C., Leroux, P., & Bardin, M. (2012). Functional and Structural Comparison of Pyrrolnitrin- and Iprodione-Induced Modifications in the Class III Histidine-Kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE*, 7(8), e42520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042520>
103. **Fioresi**, V. S., de Cássia Ribeiro Vieira, B., de Campos, J. M. S., & da Silva Souza, T. (2020). Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 28066–28076. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09201-5>
104. **Fowler**, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., ... Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130164–20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
105. **Fowler**, L., Engqvist, H., & Öhman-Mägi, C. (2019). Effect of Copper Ion Concentration on Bacteria and Cells. *Materials*, 12(22), 3798. <https://doi.org/10.3390/ma12223798>
106. **Freitag**, A., & Bock, E. (1990). Energy conservation in *Nitrobacter*. *FEMS Microbiology Letters*, 66(1–3), 157–162. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90275-U](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90275-U)
107. **Frenk**, S., Ben-Moshe, T., Dror, I., Berkowitz, B., & Minz, D. (2013). Effect of Metal Oxide Nanoparticles on Microbial Community Structure and Function in Two Different Soil Types. *PLoS ONE*, 8(12), e84441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084441>
108. **Friendly**, M. (2020). genridge: Generalized Ridge Trace Plots for Ridge Regression. R package version 0.6.7. <https://CRAN.R-project.org/package=genridge>
109. **Fukumori**, F., & Hausinger, R. P. (1993). Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/alpha-ketoglutarate dioxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24311–24317. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226980>
110. **Füssel**, J., Lückner, S., Yilmaz, P., Nowka, B., van Kessel, M. A. H. J., Bourceau, P., ... Lam, P. (2017). Adaptability as the key to success for the ubiquitous marine nitrite oxidizer *Nitrococcus*. *Science Advances*, 3(11), e1700807. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700807>
111. **Gajjar**, P., Pettee, B., Britt, D. W., Huang, W., Johnson, W. P., & Anderson, A. J. (2009). Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biological Engineering*, 3(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-9>
112. **Gao**, Y.-P., Yang, Y., Li, L., Wei, W.-J., Xu, H., Wang, Q., & Qiu, Y.-Q. (2020). Quantitative detection of gold nanoparticles in soil and sediment. *Analytica Chimica Acta*, 1110, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.005>
113. **Garbeva**, P., Baggs, E. M., & Prosser, J. I. (2007). Phylogeny of nitrite reductase (nirK) and nitric oxide reductase (norB) genes from *Nitrosospora* species isolated from soil. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00517.x>
114. **Garg**, N., & Geetanjali. (2009). Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Nodules: Process and Signaling: A Review. In *Sustainable Agriculture* (pp. 519–531). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_32
115. **Ge**, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., & Peng, Y. (2015). Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.004>
116. **Geets**, J., Boon, N., & Verstraete, W. (2006). Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(1), 1–13.

117. **Gerards**, S., Duyts, H., & Laanbroek, H. J. (1998). Ammonium-induced inhibition of ammonium-starved *Nitrosomonas europaea* cells in soil and sand slurries. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(4), 269–280. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00041-5)
118. **Giller**, K. E., Witter, E., & McGrath, S. P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2031–2037. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.026>
119. **Godfray**, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5967), 812–818.
120. **Golobič**, M., Jemec, A., Drobne, D., Romih, T., Kasemets, K., & Kahru, A. (2012). Upon Exposure to Cu Nanoparticles, Accumulation of Copper in the Isopod *Porcellio scaber* Is Due to the Dissolved Cu Ions Inside the Digestive Tract. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 12112–12119. <https://doi.org/10.1021/es3022182>
121. **Goulding**, K. W. T. (2016). Soil acidification and the importance of liming agricultural soils with particular reference to the United Kingdom. *Soil Use and Management*, 32(3), 390–399. <https://doi.org/10.1111/sum.12270>
122. **Gower**, J. C. (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties, *Biometrics* 27,857–874.
123. **Grabke**, A., Fernández-Ortuño, D., Amiri, A., Li, X., Peres, N. A., Smith, P., & Schnabel, G. (2014). Characterization of Iprodione Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry and Blackberry. *Phytopathology*, 104(4), 396–402. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0156-R>
124. **Gwak**, J.-H., Jung, M.-Y., Hong, H., Kim, J.-G., Quan, Z.-X., Reinfelder, J. R., ... Rhee, S.-K. (2020). Archaeal nitrification is constrained by copper complexation with organic matter in municipal wastewater treatment plants. *The ISME Journal*, 14(2), 335–346. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0538-1>
125. **Hachiya**, T., & Sakakibara, H. (2016). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, erw449. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw449>
126. **Han**, S., Zeng, L., Luo, X., Xiong, X., Wen, S., Wang, B., ... Huang, Q. (2018). Shifts in Nitrobacter- and Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacterial communities under long-term fertilization practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 124, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.033>
127. **Hasan**, N., Ahmad, F., & Wu, H. F. (2013). Monitoring the heat stress response of *Escherichia coli* via NiO nanoparticle assisted MALDI-TOF mass spectrometry. *Talanta*, 103, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.003>
128. **Hauck**, R. D., & Stephenson, H. F. (1965). Nitrogen Sources, Nitrification of Nitrogen Fertilizers. Effect of Nitrogen Source, Size and pH of Granule, and Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 13(6), 486–492. <https://doi.org/10.1021/jf60142a001>
129. **He**, S., Feng, Y., Ni, J., Sun, Y., Xue, L., Feng, Y., ... Yang, L. (2016). Different responses of soil microbial metabolic activity to silver and iron oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 147, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.055>
130. **Heipieper**, H. J., Keweloh, H., & Rehm, H. J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1213–1217. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.4.1213-1217.1991>
131. **Henry**, L. & Wickham, H. (2020). purrr: Functional Programming Tools. R package version 0.3.4. <https://CRAN.R-project.org/package=purrr>

- 132. Hermann, D., & Stenzel, K. (2019).** FRAC Mode-of-action Classification and Resistance Risk of Fungicides. In *Modern Crop Protection Compounds* (pp. 589–608). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527699261.ch14>
- 133. Hernández-Montes, G., Argüello, J. M., & Valderrama, B. (2012).** Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria. *BMC Microbiology*, 12(1), 249. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-249>
- 134. Hewitt, H. G., & Oliver, R. P. (2014).** *Fungicides in Crop Protection* (2nd Edition). CABI International. <https://doi.org/10.1079/9781780641669.0000>
- 135. Hippler, F. W. R., Mattos-Jr, D., Boaretto, R. M., & Williams, L. E. (2018).** Copper excess reduces nitrate uptake by Arabidopsis roots with specific effects on gene expression. *Journal of Plant Physiology*, 228, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.06.005>
- 136. Hlavac, M. (2018).** stargazer: Well-Formatted Regression and Summary Statistics Tables. R package version 5.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=stargazer>
- 137. Hobbie, J. E., Daley, R. J., & Jasper, S. (1977).** Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5), 1225–1228. <https://doi.org/10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977>
- 138. Hou, L., Xia, J., Li, K., Chen, J., Wu, X., & Li, X. (2013).** Removal of ZnO nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its effects on COD and NH₄⁺-N reduction. *Water Science and Technology*, 67(2), 254–260. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.530>
- 139. Howarth, R. W., & Marino, R. (2006).** Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades. *Limnology and Oceanography*, 51(1part2), 364–376. https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0364
- 140. Hu, Z., Chandran, K., Grasso, D., & Smets, B. F. (2002).** Effect of Nickel and Cadmium Speciation on Nitrification Inhibition. *Environmental Science & Technology*, 36(14), 3074–3078. <https://doi.org/10.1021/es015784a>
- 141. Hu, Z., Chandran, K., Grasso, D., & Smets, B. F. (2003).** Impact of Metal Sorption and Internalization on Nitrification Inhibition. *Environmental Science & Technology*, 37(4), 728–734. <https://doi.org/10.1021/es025977d>
- 142. Huang, Z., Gedalanga, P. B., Asvapathanagul, P., & Olson, B. H. (2010).** Influence of physicochemical and operational parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* communities in an aerobic activated sludge bioreactor. *Water Research*, 44(15), 4351–4358. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.037>
- 143. Huber, D. M., Warren, H. L., Nelson, D. W., & Tsai, C. Y. (1977).** Nitrification Inhibitors: New Tools for Food Production. *BioScience*, 27(8), 523–529. <https://doi.org/10.2307/1297812>
- 144. Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017).** Agriculture in 2050: Recalibrating Targets for Sustainable Intensification. *BioScience*, 67(4), 386–391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- 145. Hynes, R. K., & Knowles, R. (1978).** Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiology Letters*, 4(6), 319–321. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1978.tb02889.x>
- 146. Imfeld, G., & Vuilleumier, S. (2012).** Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology*, 49, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.010>

147. **Ishihara**, J., Mekubo, T., Kusaka, C., Kondo, S., Aiba, H., Ishikawa, S., ... Takahashi, H. (2020). Critical role of the periplasm in copper homeostasis in Gram-negative bacteria. *BioRxiv*, 2020.08.17.251918. <https://doi.org/10.1101/2020.08.17.251918>
148. **Ishii**, K., Fujitani, H., Soh, K., Nakagawa, T., Takahashi, R., & Tsuneda, S. (2017). Enrichment and Physiological Characterization of a Cold-Adapted Nitrite-Oxidizing *Nitrotoga* sp. from an Eelgrass Sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00549-17>
149. **Izushi**, F., Mori, T., & Ogata, M. (1988). Effect of phenol and halogenated phenols on energy transfer reactions of rat liver mitochondria. *Acta Medica Okayama*, 42(1), 7–14. <https://doi.org/10.18926/AMO/31035>
150. **Javed**, Z., Dashora, K., Mishra, M., D. Fasake, V., & Srivastva, A. (2019). Effect of accumulation of nanoparticles in soil health- a concern on future. *Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology*, 5(2). <https://doi.org/10.15761/FNN.1000181>
151. **Jeevanandam**, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
152. **Johnsen**, A. R., Bendixen, K., & Karlson, U. (2002). Detection of Microbial Growth on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Microtiter Plates by Using the Respiration Indicator WST-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2683–2689. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2683-2689.2002>
153. **Jones**, R. W., & Hedlin, R. A. (1970). Ammonium, nitrite and nitrate accumulation in three Manitoba soils as influenced by added ammonium sulfate and urea. *Canadian Journal of Soil Science*, 50(3), 331–338. <https://doi.org/10.4141/cjss70-043>
154. **Joo**, S. H., & Zhao, D. (2017). Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.02.068>
155. **Juliastuti**, S. R., Baeyens, J., & Creemers, C. (2003a). Inhibition of Nitrification by Heavy Metals and Organic Compounds: The ISO 9509 Test. *Environmental Engineering Science*, 20(2), 79–90. <https://doi.org/10.1089/109287503763336511>
156. **Juliastuti**, S. R., Baeyens, J., Creemers, C., Bixio, D., & Lodewyckx, E. (2003b). The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 100(1–3), 271–283. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00116-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00116-X)
157. **Kah**, M., Brown C.D. (2006) Adsorption of Ionisable Pesticides in Soils (pp. 149–217). In: Ware G.W. *et al.* (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol 188. Springer, New York, NY https://doi.org/10.1007/978-0-387-32964-2_5
158. **Kanazawa**, J. (1989). Relationship between the soil sorption constants for pesticides and their physicochemical properties. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(6), 477–484. <https://doi.org/10.1002/etc.5620080604>
159. **Kapoor**, V., Li, X., Elk, M., Chandran, K., Impellitteri, C. A., & Santo Domingo, J. W. (2015). Impact of Heavy Metals on Transcriptional and Physiological Activity of Nitrifying Bacteria. *Environmental Science & Technology*, 49(22), 13454–13462. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02748>
160. **Kaur**, A., & Gupta, U. (2009). A review on applications of nanoparticles for the preconcentration of environmental pollutants. *Journal of Materials Chemistry*, 19(44), 8279. <https://doi.org/10.1039/b901933b>

161. **Kaur, H., & Garg, H. (2014).** Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In *Pesticides - Toxic Aspects*. InTech. <https://doi.org/10.5772/57399>
162. **Kelly, M., Lappalainen, P., Talbo, G., Haltia, T., van der Oost, J., & Saraste, M. (1993).** Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center. *Journal of Biological Chemistry*, 268(22), 16781–16787. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85484-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85484-4)
163. **Keluskar, R., & Desai, A. (2014).** Evaluation of hydroxylamine oxidoreductase as a functional and phylogenetic marker to differentiate *Nitrosomonas* spp. *Journal of Basic Microbiology*, 54(4), 261–268. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200378>
164. **Kent, R. D., & Vikesland, P. J. (2016).** Dissolution and Persistence of Copper-Based Nanomaterials in Undersaturated Solutions with Respect to Cupric Solid Phases. *Environmental Science & Technology*, 50(13), 6772–6781. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04719>
165. **Kepler, R. M., Epp Schmidt, D. J., Yarwood, S. A., Cavigelli, M. A., Reddy, K. N., Duke, S. O., ... Maul, J. E. (2020).** Soil Microbial Communities in Diverse Agroecosystems Exposed to the Herbicide Glyphosate. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.01744-19>
166. **Kerou, M., & Schleper, C. (2016).** *Nitrososphaera*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–10). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01294>
167. **Khan, R., Inam, M. A., Zam Zam, S., Akram, M., Shin, S., & Yeom, I. T. (2019).** Coagulation and Dissolution of CuO Nanoparticles in the Presence of Dissolved Organic Matter Under Different pH Values. *Sustainability*, 11(10), 2825. <https://doi.org/10.3390/su11102825>
168. **Kim, K.-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017).** Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
169. **Kim, Y. M., Park, D., Lee, D. S., & Park, J. M. (2008).** Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 152(3), 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.065>
170. **Kinnear, C., Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B., & Petri-Fink, A. (2017).** Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine. *Chemical Reviews*, 117(17), 11476–11521. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00194>
171. **Kirstein, K., & Bock, E. (1993).** Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. *Archives of Microbiology*, 160(6), 447–453. <https://doi.org/10.1007/BF00245305>
172. **Kitzinger, K., Koch, H., Lücker, S., Sedlacek, C. J., Herbold, C., Schwarz, J., ... Daims, H. (2018).** Characterization of the First “Candidatus *Nitrotoga*” Isolate Reveals Metabolic Versatility and Separate Evolution of Widespread Nitrite-Oxidizing Bacteria. *MBio*, 9(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01186-18>
173. **Kocaçalışkan, I., Talan, I., & Terzi, I. (2006).** Antimicrobial Activity of Catechol and Pyrogallol as Allelochemicals. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(9–10), 639–642. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-9-1004>
174. **Kocamemi, B. A., & Çeçen, F. (2010).** Biological removal of the xenobiotic trichloroethylene (TCE) through cometabolism in nitrifying systems. *Bioresource Technology*, 101(1), 430–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.079>
175. **Kolde, R. (2019).** pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

- 176. Koops, H.-P., & Pommerening-Röser, A. (2015a).** *Nitrosospira*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–2). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00992>
- 177. Koops, H.-P., & Pommerening-Röser, A. (2015b).** *Nitrosomonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–6). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00991>
- 178. Koops, H.-P., & Pommerening-Röser, A. (2015c).** *Nitrosococcus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–3). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01111>
- 179. Kouki, S., Saidi, N., M'hiri, F., Nasr, H., Cherif, H., Ouzari, H., & Hassen, A. (2011).** Isolation and characterization of facultative mixotrophic ammonia-oxidizing bacteria from constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1699–1708. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60596-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60596-7)
- 180. Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (2001).** Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 485–529. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.485>
- 181. Kroneck, P., & Abt, D. (2002).** Molybdenum in Nitrate Reductase and Nitrite Oxidoreductase. <https://doi.org/10.1201/9780203909331.ch10>
- 182. Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., & Kirk, G. J. D. (1999).** Nitrate-Ammonium Synergism in Rice. A Subcellular Flux Analysis. *Plant Physiology*, 119(3), 1041–1046. <https://doi.org/10.1104/pp.119.3.1041>
- 183. Kuenen, J. G. (2008).** Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 320. Lewis, W. M., & Morris, D. P. (1986). Toxicity of Nitrite to Fish: A Review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115(2), 183–195.
- 184. Kumari, R., & Ghosh Sachan, S. (2019).** Bioconversion of toxic micropollutant triclosan to 2,4-dichlorophenol using a wastewater isolate *Pseudomonas aeruginosa* KS2002. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(12), 7663–7672. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2129-5>
- 185. Laffite, A., Florio, A., Andrianarisoa, K. S., Creuze des Chatelliers, C., Schloter-Hai, B., Ndaw, S. M., ... Le Roux, X. (2020).** Biological inhibition of soil nitrification by forest tree species affects *Nitrobacter* populations. *Environmental Microbiology*, 22(3), 1141–1153. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14905>
- 186. Lancaster, K. M., Caranto, J. D., Majer, S. H., & Smith, M. A. (2018).** Alternative Bioenergy: Updates to and Challenges in Nitrification Metalloenzymology. *Joule*, 2(3), 421–441. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2018.01.018>
- 187. Lang, M., & Cai, Z (2009).** Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils. *Journal of Environmental Sciences*, 21(4), 458–467. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62292-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62292-5)
- 188. Langdon, K. A., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., & Merrington, G. (2014).** The effect of soil properties on the toxicity of silver to the soil nitrification process. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(5), 1170–1178. <https://doi.org/10.1002/etc.2543>
- 189. Le Moal, M., Gascuel-Oudou, C., Ménesguen, A., Souchon, Y., Étrillard, C., Levain, A., ... Pinay, G. (2019).** Eutrophication: A new wine in an old bottle? *Science of The Total Environment*, 651, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.139>
- 190. Lederer, S., Dijkstra, T. M. H., & Heskens, T. (2018).** Additive Dose Response Models: Explicit Formulation and the Loewe Additivity Consistency Condition. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00031>
- 191. Lee, Y.-W., Ong, S.-K., & Sato, C. (1997).** Effects of heavy metals on nitrifying bacteria. *Water Science and Technology*, 36(12), 69–74. <https://doi.org/10.2166/wst.1997.0432>

192. Lee, Y.-W., Tian, Q., Ong, S. K., Sato, C., & Chung, J. (2009). Inhibitory Effects of Copper on Nitrifying Bacteria in Suspended and Attached Growth Reactors. *Water, Air, and Soil Pollution*, 203(1–4), 17–27. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-9988-9>
193. Lehtovirta-Morley, L. E., Sayavedra-Soto, L. A., Gallois, N., Schouten, S., Stein, L. Y., Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2016). Identifying Potential Mechanisms Enabling Acidophily in the Ammonia-Oxidizing Archaeon “*Candidatus Nitrosotalea devanattera*.” *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2608–2619. <https://doi.org/10.1128/AEM.04031-15>
194. Lehtovirta-Morley, L. E., Verhamme, D. T., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2013). Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 62, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.020>
195. Leistra, M., & Matser, A. M. (2004). Adsorption, Transformation, and Bioavailability of the Fungicides Carbendazim and Iprodione in Soil, Alone and in Combination. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 39(1), 1–17. <https://doi.org/10.1081/PFC-120027435>
196. Lember, E., Retšnoi, V., Pachel, K., & Loigu, E. (2018). Combined effect of heavy metals on the activated sludge process. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 65(4), 305. <https://doi.org/10.3176/proc.2018.4.02>
197. Li, X., Kapoor, V., Impelliteri, C., Chandran, K., & Domingo, J. W. S. (2016). Measuring nitrification inhibition by metals in wastewater treatment systems: Current state of science and fundamental research needs. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(3), 249–289. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1085234>
198. Li, Z., & Jennings, A. (2017). Worldwide Regulations of Standard Values of Pesticides for Human Health Risk Control: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), 826. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070826>
199. Liang, Z., Das, A., & Hu, Z. (2010). Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Research*, 44(18), 5432–5438. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.060>
200. Liao, P., Shu, X., Tang, M., Tan, B., & Yin, Y. (2018). Effect of dietary copper source (inorganic vs. chelated) on immune response, mineral status, and fecal mineral excretion in nursery piglets. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 548–563. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1416068>
201. Lim, J.-W., Ng, S.-L., Khor, S.-M., & Seng, C.-E. (2012). Inhibitory effect of 2,4-dichlorophenol on nitrogen removal in a sequencing batch reactor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29(7), 886–890. <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0267-2>
202. Liu, D., Thomson, K., & Kaiser, K. L. E. (1982). Quantitative structure-toxicity relationship of halogenated phenols on bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(2), 130–136. <https://doi.org/10.1007/BF01606140>
203. Liu, G., & Wang, J. (2012). Effects of Nano-Copper (II) Oxide and Nano-Magnesium Oxide Particles on Activated Sludge. *Water Environment Research*, 84(7), 569–576. <https://doi.org/10.2175/106143012X13373575830593>
204. Liu, Y., & von Wirén, N. (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2581–2592. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx086>
205. Loewe, S. (1928). Die quantitativen Probleme der Pharmakologie. *Ergebnisse Der Physiologie*, 27(1), 47–187. <https://doi.org/10.1007/BF02322290>
206. Lu, P.-J., Huang, S.-C., Chen, Y.-P., Chiueh, L.-C., & Shih, D. Y.-C. (2015). Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.009>

- 207. Lu, Y., Zhang, X., Jiang, J., Kronzucker, H. J., Shen, W., & Shi, W. (2019).** Effects of the biological nitrification inhibitor 1,9-decanediol on nitrification and ammonia oxidizers in three agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 129, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.11.008>
- 208. Lückner, S., Schwarz, J., Gruber-Dorninger, C., Spieck, E., Wagner, M., & Daims, H. (2015).** *Nitrotoga*-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants. *The ISME Journal*, 9(3), 708–720. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.158>
- 209. Ma, C., White, J. C., Zhao, J., Zhao, Q., & Xing, B. (2018).** Uptake of Engineered Nanoparticles by Food Crops: Characterization, Mechanisms, and Implications. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 129–153. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012657>
- 210. Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K (2021).** cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.1.2, <https://CRAN.R-project.org/package=cluster>.
- 211. Mahdi, K. N. M., Peters, R. J. B., Klumpp, E., Bohme, S., Ploeg, M. van der, Ritsema, C., & Geissen, V. (2017).** Silver nanoparticles in soil: Aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 7, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2016.12.002>
- 212. Mahmood, T., Ali, R., Lodhi, A., & Sajid, M. (2017).** 4-Amino-1,2,4-triazole can be more effective than commercial nitrification inhibitors at high soil temperatures. *Soil Research*, 55(7), 715. <https://doi.org/10.1071/SR16340>
- 213. Maia, L. B., & Moura, J. J. G. (2014).** How Biology Handles Nitrite. *Chemical Reviews*, 114(10), 5273–5357. <https://doi.org/10.1021/cr400518y>
- 214. Maixner, F., Noguera, D. R., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl, G., Wagner, M., & Daims, H. (2006).** Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environmental Microbiology*, 8(8), 1487–1495. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01033.x>
- 215. Majedi, S. M., Kelly, B. C., & Lee, H. K. (2014).** Role of combinatorial environmental factors in the behavior and fate of ZnO nanoparticles in aqueous systems: A multiparametric analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.015>
- 216. Mamonova, I. A., Babushkina, I. V., Norkin, I. A., Gladkova, E. V., Matasov, M. D., & Puchin'yan, D. M. (2015).** Biological activity of metal nanoparticles and their oxides and their effect on bacterial cells. *Nanotechnologies in Russia*, 10(1–2), 128–134. <https://doi.org/10.1134/S1995078015010139>
- 217. Mandl, K., Cantelmo, C., Gruber, E., Faber, F., Friedrich, B., & Zaller, J. G. (2018).** Effects of Glyphosate-, Glufosinate- and Flazasulfuron-Based Herbicides on Soil Microorganisms in a Vineyard. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(5), 562–569. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2438-x>
- 218. Mangiafico, S. (2020).** rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation. R package version 2.3.26. <https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion>
- 219. Manzo, S., Rocco, A., Carotenuto, R., De Luca Picione, F., Miglietta, M. L., Rametta, G., & Di Francia, G. (2011).** Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(5), 756–763. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0421-0>

- 220. Margni, M.,** Rossier, D., Crettaz, P., & Jolliet, O. (2002). Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93(1–3), 379–392. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00336-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00336-X)
- 221. Martens, D. A.,** & Bremner, J. M. (1993). Influence of herbicides on transformations of urea nitrogen in soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 28(4), 377–395. <https://doi.org/10.1080/03601239309372831>
- 222. Martínez-Gutiérrez, E.,** Texier, A., López, F. de M. C., & Gómez, J. (2017). Denitrification in the Presence of Chlorophenols: Progress and Prospects. In *Nitrification and Denitrification*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68860>
- 223. Mazellier, P.,** Leroy, É., & Legube, B. (2002). Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 153(1–3), 221–227. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(02\)00296-4](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(02)00296-4)
- 224. Mazzei, L.,** Cianci, M., Musiani, F., Lente, G., Palombo, M., & Ciurli, S. (2017). Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 166, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.016>
- 225. McCarty, G. W.** (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 29(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s003740050518>
- 226. McCarty, G. W.,** & Bremner, J. M. (1990b). Persistence of effects of nitrification inhibitors added to soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 21(7–8), 639–648. <https://doi.org/10.1080/00103629009368259>
- 227. McGee, C. F.,** Storey, S., Clipson, N., & Doyle, E. (2017). Soil microbial community responses to contamination with silver, aluminium oxide and silicon dioxide nanoparticles. *Ecotoxicology*, 26(3), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1776-5>
- 228. Mekonnen, Z.** (2019). Observed and Projected Reciprocate Effects of Agriculture and Climate Change: Implications on Ecosystems and Human Livelihoods. In *Climate Change and Global Warming*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79118>
- 229. Mellbye, B. L.,** Giguere, A. T., Murthy, G. S., Bottomley, P. J., Sayavedra-Soto, L. A., & Chaplen, F. W. R. (2018). Genome-Scale, Constraint-Based Modeling of Nitrogen Oxide Fluxes during Coculture of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*. *MSystems*, 3(3), e00170-17.
- 230. Mercadier, C.,** Vega, D., & Bastide, J. (1997). Iprodione degradation by isolated soil microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(3), 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00403.x>
- 231. Merel, S.,** Benzing, S., Gleiser, C., Di Napoli-Davis, G., & Zwiener, C. (2018). Occurrence and overlooked sources of the biocide carbendazim in wastewater and surface water. *Environmental Pollution*, 239, 512–521. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.040>
- 232. Mérigout, P.,** Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J.-P., Briand, X., Meyer, C., & Daniel-Vedele, F. (2008). Physiological and Transcriptomic Aspects of Urea Uptake and Assimilation in *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology*, 147(3), 1225–1238. <https://doi.org/10.1104/pp.108.119339>
- 233. Mokhele, B.,** Zhan, X., Yang, G., & Zhang, X. (2012). Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(3), 399–405. <https://doi.org/10.4141/CJPS2011-135>
- 234. Mukherjee, A.,** Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J., & White, J. C. (2016). Effects and Uptake of Nanoparticles in Plants. In *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity* (pp. 386–408). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119275855.ch20>

235. **Müller**, K. & Wickham, H. (2020). tibble: Simple Data Frames. R package version 3.0.4. <https://CRAN.R-project.org/package=tibble>
236. **Musmann**, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinninghe Damste, J. S., Hatzenpichler, R., Richter, A., ... Head, I. M. (2011). Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), 16771–16776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106427108>
237. **Nakagawa**, T., & Stahl, D. A. (2013). Transcriptional Response of the Archaeal Ammonia Oxidizer *Nitrosopumilus maritimus* to Low and Environmentally Relevant Ammonia Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 6911–6916. <https://doi.org/10.1128/AEM.02028-13>
238. **Navratilova**, J., Praetorius, A., Gondikas, A., Fabienke, W., von der Kammer, F., & Hofmann, T. (2015). Detection of Engineered Copper Nanoparticles in Soil Using Single Particle ICP-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(12), 15756–15768. <https://doi.org/10.3390/ijerph121215020>
239. **Navya**, P. N., & Daima, H. K. (2016). Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Convergence*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40580-016-0064-z>
240. **Nel**, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., ... Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8(7), 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
241. **Norton**, J. M., Klotz, M. G., Stein, L. Y., Arp, D. J., Bottomley, P. J., Chain, P. S. G., ... Starkenburg, S. R. (2008). Complete Genome Sequence of *Nitrosospira multiformis*, an Ammonia-Oxidizing Bacterium from the Soil Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3559–3572. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-07>
242. **Nowka**, B., Daims, H., & Spieck, E. (2015). Comparison of Oxidation Kinetics of Nitrite-Oxidizing Bacteria: Nitrite Availability as a Key Factor in Niche Differentiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 745–753. <https://doi.org/10.1128/AEM.02734-14>
243. **Ohashi**, Y., Yamada, K., Takemoto, I., Mizutani, T., & Saeki, K. (2005). Inhibition of Human Cytochrome P450 2E1 by Halogenated Anilines, Phenols, and Thiophenols. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(7), 1221–1223. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1221>
244. **Okabe**, S., Aoi, Y., Satoh, H., & Suwa, Y. (2011). Nitrification in Wastewater Treatment. In B. Ward, D. Arp, & M. Klotz (Eds.), *Nitrification* (pp. 405–433). Washington, DC: American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555817145.ch16>
245. **Oke**, O. L. (1966). Nitrite Toxicity to Plants. *Nature*, 212(5061), 528–528. <https://doi.org/10.1038/212528a0>
246. **Oksanen**, F.J., et al. (2017) Vegan: Community Ecology Package. R package Version 2.4-3. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
247. **Onyutha**, C. (2018). African crop production trends are insufficient to guarantee food security in the sub-Saharan region by 2050 owing to persistent poverty. *Food Security*, 10(5), 1203–1219. <https://doi.org/10.1007/s12571-018-0839-7>
248. **Oriekhova**, O., & Stoll, S. (2016). Effects of pH and fulvic acids concentration on the stability of fulvic acids – cerium (IV) oxide nanoparticle complexes. *Chemosphere*, 144, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.057>

- 249. Ortiz-Hernández**, M.L., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E., & Castrejón-Godínez, M.L. (2013). Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. In *Biodegradation - Life of Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56098>
- 250. Osorio**, D., Rondon-Villarreal, P. & Torres, R. (2015) Peptides: A package for data mining of antimicrobial peptides. *The R Journal*. 7(1), 4-14.
- 251. Özkara**, A., Akyil, D., & Konuk, M. (2016). Pesticides, Environmental Pollution, and Health. In *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63094>
- 252. Pagoni**, A., Daliani, T., Macegoniuk, K., Vassiliou, S., & Berlicki, Ł. (2019). Catechol-based inhibitors of bacterial urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(9), 1085–1089. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.02.032>
- 253. Pal**, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- 254. Panda**, J., Kanjilal, T., & Das, S. (2018). Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide Carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.004>
- 255. Pappas**, A. C., & Fisher, D. J. (1979). A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science*, 10(3), 239–246. <https://doi.org/10.1002/ps.2780100308>
- 256. Parada**, J., Rubilar, O., Diez, M. C., Cea, M., Sant'Ana da Silva, A., Rodríguez-Rodríguez, C. E., & Tortella, G. R. (2019). Combined pollution of copper nanoparticles and atrazine in soil: Effects on dissipation of the pesticide and on microbiological community profiles. *Journal of Hazardous Materials*, 361(April 2018), 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.042>
- 257. Paramo**, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., & Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in Agroindustry: Applications, Toxicity, Challenges, and Trends. *Nanomaterials*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/nano10091654>
- 258. Pariona**, N., Mtz-Enriquez, A. I., Sánchez-Rangel, D., Carrión, G., Paraguay-Delgado, F., & Rosas-Saito, G. (2019). Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens. *RSC Advances*, 9(33), 18835–18843. <https://doi.org/10.1039/C9RA03110C>
- 259. Park**, S., & Ely, R. L. (2008a). Genome-wide transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to zinc. *Archives of Microbiology*, 189(6), 541–548. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0341-7>
- 260. Park**, S., & Ely, R. L. (2008b). Candidate Stress Genes of *Nitrosomonas europaea* for Monitoring Inhibition of Nitrification by Heavy Metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5475–5482. <https://doi.org/10.1128/AEM.00500-08>
- 261. Parmar**, J. H., Quintana, J., Ramírez, D., Laubenbacher, R., Argüello, J. M., & Mendes, P. (2018). An important role for periplasmic storage in *Pseudomonas aeruginosa* copper homeostasis revealed by a combined experimental and computational modeling study. *Molecular Microbiology*, 110(3), 357–369. <https://doi.org/10.1111/mmi.14086>
- 262. Parra**, B., Tortella, G. R., Cuozzo, S., & Martínez, M. (2019). Negative effect of copper nanoparticles on the conjugation frequency of conjugative catabolic plasmids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169(November 2018), 662–668. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.057>

- 263. Pastor**, A. V., Palazzo, A., Havlik, P., Biemans, H., Wada, Y., Obersteiner, M., ... Ludwig, F. (2019). The global nexus of food–trade–water sustaining environmental flows by 2050. *Nature Sustainability*, 2(6), 499–507. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0287-1>
- 264. Peng**, C., Tong, H., Yuan, P., Sun, L., Jiang, L., & Shi, J. (2019). Aggregation, sedimentation, and dissolution of copper oxide nanoparticles: Influence of low-molecular-weight organic acids from root exudates. *Nanomaterials*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/nano9060841>
- 265. Peterson**, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., & Stahlman, P. W. (2016). 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. *Weed Technology*, 30(2), 303–345. <https://doi.org/10.1614/WT-D-15-00131.1>
- 266. Pettinger**, N. W., Empey, J. M., Fröbel, S., & Kohler, B. (2020). Photoreductive dissolution of cerium oxide nanoparticles and their size-dependent absorption properties. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(10), 5756–5764. <https://doi.org/10.1039/C9CP06579B>
- 267. Phan**, D. C., Pasha, A. B. M. T., Carwile, N., & Kapoor, V. (2020). Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Physiological Activities and Gene Expression of Wastewater Nitrifying Bacteria. *Environmental Engineering Science*, 37(5), 328–336. <https://doi.org/10.1089/ees.2019.0385>
- 268. Phipps**, R. H., & Cornforth, I. S. (1970). Factors effecting the toxicity of nitrite nitrogen to tomatoes. *Plant and Soil*, 33(1–3), 457–466. <https://doi.org/10.1007/BF01378234>
- 269. Poh**, R., Xia, X., Bruce, I. J., & Smith, A. R. (2001). 2,4-dichlorophenoxyacetate/alpha-ketoglutarate dioxygenases from *Burkholderia cepacia* 2a and *Ralstonia eutropha* JMP134. *Microbios*, 105(410), 43–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368091>
- 270. Pommerening-Röser**, A., Rath, G., & Koops, H.-P. (1996). Phylogenetic Diversity within the Genus *Nitrosomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(3), 344–351. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80061-0)
- 271. Poux**, X & Aubert P.M (2018) An agroecological Europe in 2050: multifunctional agriculture for healthy eating. Findings from the Ten Years For Agroecology (TYFA) modeling exercise. Disponible en: <https://www.iddri.org/sites/default/files/PDF/Publications/Catalogue%20Iddri/Etude/201809-ST0918EN-tyfa.pdf>. Accedido en 15 Mayo 2020.
- 272. Prashar**, P., & Shah, S. (2016). Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture (pp. 331–361). https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_8
- 273. Prosser**, J. I. (1990). Autotrophic Nitrification in Bacteria. In *Advances in Microbial Physiology* Vol. 30 (pp. 125–181). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60112-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60112-5)
- 274. Prosser**, J. I., & Nicol, G. W. (2016). Candidatus *Nitrosotalea*. In P. W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* Wiley-Blackwell . <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01292>
- 275. Qiao**, C., Liu, L., Hu, S., Compton, J. E., Greaver, T. L., & Li, Q. (2015). How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input. *Global Change Biology*, 21(3), 1249–1257. <https://doi.org/10.1111/gcb.12802>
- 276. Qin**, W., Martens-Habbena, W., Kobelt, J. N., & Stahl, D. A. (2016). Candidatus *Nitrosopumilus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–9). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01290>

277. **Quan**, X., Shi, H., Zhang, Y., Wang, J., & Qian, Y. (2004). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol in an airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp. *Separation and Purification Technology*, 34(1–3), 97–103. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(03\)00181-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(03)00181-3)
278. **Quinteros**, M. A., Cano Aristizábal, V., Dalmasso, P. R., Paraje, M. G., & Páez, P. L. (2016). Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro*, 36, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007>
279. **R Core Team** (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
280. **Radice**, S., Ferraris, M., Marabini, L., Grande, S., & Chiesara, E. (2001). Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 54(1–2), 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00175-2)
281. **Radniecki**, T. S., Semprini, L., & Dolan, M. E. (2009). Expression of *merA*, *trxA*, *amoA*, and *hao* in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to cadmium sulfate additions. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(5), 1004–1011. <https://doi.org/10.1002/bit.22454>
282. **Radniecki**, T. S., Stankus, D. P., Neigh, A., Nason, J. A., & Semprini, L. (2011). Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere*, 85(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.039>
283. **Raffi**, M., Mehrwan, S., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., Yawar, W., & ul Hasan, M. M. (2010). Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 60(1), 75–80. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0015-6>
284. **Rai**, J. P. N. (1992). Effects of long-term 2,4-D application on microbial populations and biochemical processes in cultivated soil. *Biology and Fertility of Soils*, 13(3), 187–191. <https://doi.org/10.1007/BF00336278>
285. **Rajput**, V. D., Minkina, T. M., Behal, A., Sushkova, S. N., Mandzhieva, S., Singh, R., ... Movsesyan, H. S. (2018a). Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 9, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.12.006>
286. **Rajput**, V. D., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Tsitsuashvili, V., Chaplugin, V., & Fedorenko, A. (2018b). Effects of Copper Nanoparticles (CuO NPs) on Crop Plants: a Mini Review. *BioNanoScience*, 8(1), 36–42. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0466-3>
287. **Rajput**, V., Minkina, T., Sushkova, S., Behal, A., Maksimov, A., Blicharska, E., ... Barsova, N. (2020). ZnO and CuO nanoparticles: a threat to soil organisms, plants, and human health. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(1), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00317-3>
288. **Ramírez**, M., Obrzydowski, J., Ayers, M., Virparia, S., Wang, M., Stefan, K., ... Castignetti, D. (2014). Pyruvic Oxime Nitrification and Copper and Nickel Resistance by a *Cupriavidus pauculus* an Active Heterotrophic Nitrifier-Denitrifier. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/901702>
289. **Rankin**, G., Hicks, W. M., Ju, J., Vidrine, D., Racine, C., & Anestis, D. (2020). Comparative In Vitro Nephrotoxicity of Three 3,5-Dihaloanilines in Isolated Renal Cortical Cells from Male Fischer 344 Rats. *The FASEB Journal*, 34(S1), 1–1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.03358>

- 290. Ratcliffe**, D. A. (1970). Changes Attributable to Pesticides in Egg Breakage Frequency and Eggshell Thickness in Some British Birds. *The Journal of Applied Ecology*, 7(1), 67. <https://doi.org/10.2307/2401613>
- 291. Ratnayake**, M., & Audus, L. J. (1978). Studies on the effects of herbicides on soil nitrification, II. Pesticide Biochemistry and Physiology, 8(2), 170–185. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(78\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0048-3575(78)90037-8)
- 292. Ray**, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE*, 8(6), e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
- 293. Recio**, J., Alvarez, J. M., Rodriguez-Quijano, M., & Vallejo, A. (2019). Nitrification inhibitor DMP5A mitigated N₂O emission and promoted NO sink in rainfed wheat. *Environmental Pollution*, 245, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.135>
- 294. Reddy**, K. J., Wang, L., & Gloss, S. P. (1995). Solubility and mobility of copper, zinc and lead in acidic environments. *Plant and Soil*, 171(1), 53–58. <https://doi.org/10.1007/BF00009564>
- 295. Reed**, R. B., Ladner, D. A., Higgins, C. P., Westerhoff, P., & Ranville, J. F. (2012). Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), 93–99. <https://doi.org/10.1002/etc.708>
- 296. Reyes**, C., Hodgskiss, L. H., Baars, O., Kerou, M., Bayer, B., Schleper, C., & Kraemer, S. M. (2020). Copper limiting threshold in the terrestrial ammonia oxidizing archaeon *Nitrososphaera viennensis*. *Research in Microbiology*, 171(3–4), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.01.003>
- 297. Robinson**, D., Hayes, A. & Couch, S. (2020). broom: Convert Statistical Objects into Tidy Tibbles. R package version 0.7.2. <https://CRAN.R-project.org/package=broom>
- 298. Robinson**, N. J., & Winge, D. R. (2010). Copper Metallochaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 537–562. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030409-143539>
- 299. Sabarwal**, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- 300. Sahrawat**, K. L. (1974). Effect of pesticides on nitrification. *Pesticides*, 30–33. Retrieved from http://oar.icrisat.org/4535/1/Pesticide_30-33_1974.pdf
- 301. Sandrin**, T. R., & Maier, R. M. (2003). Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 1093–1101. <https://doi.org/10.1289/ehp.5840>
- 302. Scheirer**, C. J., Ray, W. S., & Hare, N. (1976). The Analysis of Ranked Data Derived from Completely Randomized Factorial Designs. *Biometrics*, 32(2), 429. <https://doi.org/10.2307/2529511>
- 303. Schroder**, J. L., Zhang, H., Girma, K., Raun, W. R., Penn, C. J., & Payton, M. E. (2011). Soil Acidification from Long-Term Use of Nitrogen Fertilizers on Winter Wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 75(3), 957–964. <https://doi.org/10.2136/sssaj2010.0187>
- 304. Schulz**, B., & Segobye, K. (2016). 2,4-D transport and herbicide resistance in weeds. *Journal of Experimental Botany*, 67(11), 3177–3179. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw199>
- 305. Schwabe**, F., Schulin, R., Rupper, P., Rotzetter, A., Stark, W., & Nowack, B. (2014). Dissolution and transformation of cerium oxide nanoparticles in plant growth media. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(10), 2668. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2668-8>

- 306. Schwegmann, H., & Frimmel, F. H. (2010).** Nanoparticles: Interaction with Microorganisms. In *Nanoparticles in the Water Cycle* (pp. 165–182). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10318-6_10
- 307. Schweigert, N., Acero, J. L., von Gunten, U., Canonica, S., Zehnder, A. J. B., & Eggen, R. I. L. (2000).** DNA degradation by the mixture of copper and catechol is caused by DNA-copper-hydroperoxo complexes, probably DNA-Cu(I)OOH. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36(1), 5–12. [https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2000\)36:1<5::AID-EM2>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2000)36:1<5::AID-EM2>3.0.CO;2-4)
- 308. Schweigert, N., Zehnder, A. J. B., & Eggen, R. I. L. (2001).** Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. Minireview. *Environmental Microbiology*, 3(2), 81–91. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00176.x>
- 309. Schwertfeger, D. M., Velicogna, J. R., Jesmer, A. H., Saatcioglu, S., McShane, H., Scroggins, R. P., & Princz, J. I. (2017).** Extracting Metallic Nanoparticles from Soils for Quantitative Analysis: Method Development Using Engineered Silver Nanoparticles and SP-ICP-MS. *Analytical Chemistry*, 89(4), 2505–2513. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04668>
- 310. Seabra, A., & Durán, N. (2015).** Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals*, 5(2), 934–975. <https://doi.org/10.3390/met5020934>
- 311. Sekine, R., Marzouk, E. R., Khaksar, M., Scheckel, K. G., Stegemeier, J. P., Lowry, G. V., ... Lombi, E. (2017).** Aging of Dissolved Copper and Copper-based Nanoparticles in Five Different Soils: Short-term Kinetics vs. Long-term Fate. *Journal of Environment Quality*, 46(6), 1198. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.12.0485>
- 312. Shah, V., & Belozerova, I. (2009).** Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197(1–4), 143–148. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9797-6>
- 313. Shah, V., Luxton, T. P., Walker, V. K., Brumfield, T., Yost, J., Shah, S., ... Kambhampati, M. (2016).** Fate and impact of zero-valent copper nanoparticles on geographically-distinct soils. *Science of The Total Environment*, 573, 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.114>
- 314. Shi, J., Peng, C., Yang, Y., Yang, J., Zhang, H., Yuan, X., ... Hu, T. (2014).** Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens*. *Nanotoxicology*, 8(2), 179–188. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.766768>
- 315. Shionoiri, N., Sato, T., Fujimori, Y., Nakayama, T., Nemoto, M., Matsunaga, T., & Tanaka, T. (2012).** Investigation of the antiviral properties of copper iodide nanoparticles against feline calicivirus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(5), 580–586. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.006>
- 316. Sigurdarson, J. J., Svane, S., & Karring, H. (2018).** The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(2), 241–258. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9466-1>
- 317. Simonin, M., Guyonnet, J. P., Martins, J. M. F., Ginot, M., & Richaume, A. (2015).** Influence of soil properties on the toxicity of TiO₂ nanoparticles on carbon mineralization and bacterial abundance. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.004>
- 318. Singh, S. N., & Verma, A. (2007).** Environmental Review: The Potential of Nitrification Inhibitors to Manage the Pollution Effect of Nitrogen Fertilizers in Agricultural and Other Soils: A Review. *Environmental Practice*, 9(4), 266–279. <https://doi.org/10.1017/S1466046607070482>

- 319. Singh, S., Kumar, V., Singh, S., & Singh, J. (2019).** Influence of humic acid, iron and copper on microbial degradation of fungicide Carbendazim. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101196. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101196>
- 320. Singh, S., Singh, N., Kumar, V., Datta, S., Wani, A. B., Singh, D., ... Singh, J. (2016).** Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*, 14(3), 317–329. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0566-2>
- 321. Slangen, J., & Kerkhoff, P. (1984).** Nitrification inhibitors in agriculture and horticulture: A literature review. *Fertilizer Research*, 5(1), 1–76. <https://doi.org/10.1007/BF01049492>
- 322. Smeets, E., Faaij, A., Lewadowski, I., & Turkenburg, W. (2007).** A bottom-up assessment and review of global bio-energy potentials to 2050. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(1), 56–106. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2006.08.001>
- 323. 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>
- 324. Solla, S. R. de, & Martin, P. A. (2011).** Absorption of current use pesticides by snapping turtle (*Chelydra serpentina*) eggs in treated soil. *Chemosphere*, 85(5), 820–825. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.080>
- 325. Son, J., Vavra, J., & Forbes, V. E. (2015).** Effects of water quality parameters on agglomeration and dissolution of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) using a central composite circumscribed design. *Science of The Total Environment*, 521–522, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.093>
- 326. Sorokin, D. Y., Lückner, S., Vejmekova, D., Kostrikina, N. A., Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I. C., ... Daims, H. (2012).** Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *The ISME Journal*, 6(12), 2245–2256. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.70>
- 327. Sorokin, D. Y., Vejmekova, D., Lückner, S., Streshinskaya, G. M., Rijpstra, W. I. C., Sinnighe Damsté, J. S., ... Daims, H. (2014).** *Nitrolancea hollandica* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium isolated from a bioreactor belonging to the phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_6), 1859–1865. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062232-0>
- 328. Souza, J., & de Aguiar Junior, T. R. (2020).** Efficiency of Nitrifying and Denitrifying Bacteria in Removing Micropollutants in Water Samples. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(4), 180. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04523-z>
- 329. Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015).** IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- 330. Spieck, E., & Bock, E. (2015a).** *Nitrobacter*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–11). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00803>
- 331. Spieck, E., & Bock, E. (2015b).** *Nitrococcus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–7). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01130>
- 332. Spieck, E., & Bock, E. (2015c).** *Nitrospina*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–7). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01028>
- 333. Spieck, E., & Bock, E. (2015d).** *Nitrospira*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–4). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00780>

- 334. Spieck, E., & Lipski, A. (2011).** Chapter five - Cultivation, Growth Physiology, and Chemotaxonomy of Nitrite-Oxidizing Bacteria. In M. G. Klotz (Ed.), *Research on Nitrification and Related Processes, Part A (Methods in Enzymology Vol. 486)*, pp. 109–130. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381294-0.00005-5>
- 335. Spieck, E., Aamand, J., Bartosch, S., & Bock, E. (1996).** Immunocytochemical detection and location of the membrane-bound nitrite oxidoreductase in cells of *Nitrobacter* and *Nitrospira*. *FEMS Microbiology Letters*, 139(1), 71–76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08181.x>
- 336. Starkenburg, S. R., Chain, P. S. G., Sayavedra-Soto, L. A., Hauser, L., Land, M. L., Larimer, F. W., ... Hickey, W. J. (2006).** Genome Sequence of the Chemolithoautotrophic Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2050–2063. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2050-2063.2006>
- 337. Starkenburg, S. R., Arp, D. J., & Bottomley, P. J. (2008).** Expression of a putative nitrite reductase and the reversible inhibition of nitrite-dependent respiration by nitric oxide in *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3036–3042. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01763.x>
- 338. Stratton, M. L., Good, G. L., & Barker, A. V. (2002).** Effects of selected soil fungicides on nitrification and growth of privet in a Pine Bark medium. *Journal of Plant Nutrition*, 25(1), 159–168. <https://doi.org/10.1081/PLN-100108787>
- 339. Strecker, M., Sickinger, E., English, R. S., & Shively, J. M. (1994).** Calvin cycle genes in *Nitrobacter vulgaris* T3. *FEMS Microbiology Letters*, 120(1–2), 45–50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07005.x>
- 340. Suárez-Ojeda, M. E., Guisasola, A., & Carrera, J. (2010).** Inhibitory impact of quinone-like compounds over partial nitrification. *Chemosphere*, 80(4), 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.041>
- 341. Subbarao, G. V., Nakahara, K., Hurtado, M. P., Ono, H., Moreta, D. E., Salcedo, A. F., ... Ito, O. (2009).** Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17302–17307. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903694106>
- 342. Subbarao, G. V., Nakahara, K., Ishikawa, T., Ono, H., Yoshida, M., Yoshihashi, T., ... Sahrawat, K. L. (2013).** Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil*, 366(1–2), 243–259. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1419-9>
- 343. Sucipto, T. H., Churrotin, S., Setyawati, H., Kotaki, T., Martak, F., & Soegijanto, S. (2017).** Antiviral activity of Copper (II)chloride dihydrate against dengue virus type-2 in vero cell. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 6(4), 84. <https://doi.org/10.20473/ijtid.v6i4.3806>
- 344. Sun, L., Lu, Y., Yu, F., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2016).** Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency. *New Phytologist*, 212(3), 646–656. <https://doi.org/10.1111/nph.14057>
- 345. Sun, X., Kop, L. F. M., Lau, M. C. Y., Frank, J., Jayakumar, A., Lücker, S., & Ward, B. B. (2019).** Uncultured *Nitrospina*-like species are major nitrite oxidizing bacteria in oxygen minimum zones. *The ISME Journal*, 13(10), 2391–2402. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0443-7>
- 346. Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B., & Bock, E. (1984).** Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrate reductase system. *Archives of Microbiology*, 140(2–3), 153–158. <https://doi.org/10.1007/BF00454918>

347. **Tabuchi**, M., Abiko, T., & Yamaya, T. (2007). Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2319–2327. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm016>
348. **Tadeo**, J. L. (Eds.). (2008). *Pesticides in Food and Environmental Samples In: Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*. CRC Press. Boca Raton, pp 1-34. <https://doi.org/10.1201/9781420007756>
349. **Tahri**, N., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. In *Biodegradation - Life of Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56194>
350. **Tang**, J., Wennerberg, K., & Aittokallio, T. (2015). What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00181>
351. **Tang**, W.-W., Zeng, G.-M., Gong, J.-L., Liang, J., Xu, P., Zhang, C., & Huang, B.-B. (2014). Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review. *Science of The Total Environment*, 468–469, 1014–1027. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.044>
352. **Theng**, B. K. G., & Yuan, G. (2008). Nanoparticles in the Soil Environment. *Elements*, 4(6), 395–399. <https://doi.org/10.2113/gselements.4.6.395>
353. **Theurl**, M. C., Lauk, C., Kalt, G., Mayer, A., Kaltenegger, K., Morais, T. G., ... Haberl, H. (2020). Food systems in a zero-deforestation world: Dietary change is more important than intensification for climate targets in 2050. *Science of The Total Environment*, 735, 139353. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139353>
354. **Thompson**, F. R., & Corke, C. T. (1969). Persistence and effects of some chlorinated anilines on nitrification in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 15(7), 791–796. <https://doi.org/10.1139/m69-138>
355. **Tokutake**, N., Miyoshi, H., & Fujita, T. (1991). Electron transport inhibition of the cytochrome bc1 complex of rat-liver mitochondria by phenolic uncouplers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1057(3), 377–383. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80151-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80151-3)
356. **Tong**, N., Yuan, J., Xu, H., Huang, S., Sun, C., Wen, X., & Zhang, Y. (2019). Effects of 2,4,6-trichlorophenol on simultaneous nitrification and denitrification: Performance, possible degradation pathway and bacterial community structure. *Bioresource Technology*, 290, 121757. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121757>
357. **Tourinho**, P. S., van Gestel, C. A. M., Lofts, S., Svendsen, C., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2012). Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), 1679–1692. <https://doi.org/10.1002/etc.1880>
358. **Tourna**, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Konneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., ... Schleper, C. (2011). *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8420–8425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013488108>
359. **Trevors**, J. T., & Cotter, C. M. (1990). Copper toxicity and uptake in microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology*, 6(2), 77–84. <https://doi.org/10.1007/BF01576426>
360. **Tsai**, Y.-L., & Tuovinen, O. H. (1989). Influence of metals on oxygen uptake, carbon dioxide fixation, and cytochrome reduction in *Nitrobacter agilis*. *Toxicity Assessment*, 4(2), 185–198. <https://doi.org/10.1002/tox.2540040207>
361. **Turner**, H., Tourny, A., Thas, O., Nazarov, O., Bagdziunas, R., & Hawinkel, S. (2020). BIGL: Biochemically Intuitive Generalized Loewe Model. R package version 1.6.0. <https://github.com/openanalytics/BIGL>

- 362. Twarog, N. R.** (2016). braidrm: Fitting Dose Response with the BRAID Combined Action Model. R package version 0.71. <https://CRAN.R-project.org/package=braidrm>
- 363. Twarog, N. R., Stewart, E., Hammill, C. V., & Shelat, A. A.** (2016). BRAID: A unifying paradigm for the analysis of combined drug action. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep25523>
- 364. Vadivelu, V. M., Yuan, Z., Fux, C., & Keller, J.** (2006). Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrobacter* in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6), 1176–1188. <https://doi.org/10.1002/bit.20956>
- 365. Vale, G., Franco, C., Brunnert, A. M., & Correia dos Santos, M. M.** (2015). Adsorption of Cadmium on Titanium Dioxide Nanoparticles in Freshwater Conditions - A Chemodynamic Study. *Electroanalysis*, 27(10), 2439–2447. <https://doi.org/10.1002/elan.201500153>.
- 366. Van Der Borght, K., Tourny, A., Bagdziunas, R., Thas, O., Nazarov, M., Turner, H., ... Ceulemans, H.** (2017). BIGL: Biochemically Intuitive Generalized Loewe null model for prediction of the expected combined effect compatible with partial agonism and antagonism. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18068-5>
- 367. Van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., ... Lücker, S.** (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- 368. VandeVoort, A., & Arai, Y.** (2018). Macroscopic Observation of Soil Nitrification Kinetics Impacted by Copper Nanoparticles: Implications for Micronutrient Nanofertilizer. *Nanomaterials*, 8(11), 927. <https://doi.org/10.3390/nano8110927>
- 369. Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suciú, N., Pappolla, R. A., ... Karpouzias, D. G.** (2018). Blame It on the Metabolite: 3,5-Dichloroaniline Rather than the Parent Compound Is Responsible for the Decreasing Diversity and Function of Soil Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22). <https://doi.org/10.1128/AEM.01536-18>
- 370. Vela-Corcía, D., Romero, D., de Vicente, A., & Pérez-García, A.** (2018). Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Scientific Reports*, 8(1), 7161. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25336-5>
- 371. Venables, W. N. & Ripley, B. D.** (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- 372. Vigário, A. F., & Sabóia-Morais, S. M. T.** (2014). Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(6), 523–528. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000600005>
- 373. Wagner, F. B., Diwan, V., Dechesne, A., Fowler, S. J., Smets, B. F., & Albrechtsen, H.-J.** (2019). Copper-Induced Stimulation of Nitrification in Biological Rapid Sand Filters for Drinking Water Production by Proliferation of *Nitrosomonas* spp. *Environmental Science & Technology*, 53(21), 12433–12441. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03885>
- 374. Walker, C. B., de la Torre, J. R., Klotz, M. G., Urakawa, H., Pinel, N., Arp, D. J., ... Stahl, D. A.** (2010). *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8818–8823. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913533107>
- 375. Wallace, A.** (1994). Soil acidification from use of too much fertilizer. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25(1–2), 87–92. <https://doi.org/10.1080/00103629409369010>

376. **Wang, W & Reed P.** (1983) *Nitrobacter* as an indicator of toxicity in wastewater, Illinois Department of Energy and Natural Resources. <http://hdl.handle.net/2142/73152>
377. **Wang, C., Wang, F., Zhang, Q., & Liang, W.** (2016a). Individual and combined effects of tebuconazole and carbendazim on soil microbial activity. *European Journal of Soil Biology*, 72, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.12.005>
378. **Wang, D., & Chen, Y.** (2016). Critical review of the influences of nanoparticles on biological wastewater treatment and sludge digestion. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(5), 816–828. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1049509>
379. **Wang, J., Shu, K., Zhang, L., & Si, Y.** (2017a). Effects of Silver Nanoparticles on Soil Microbial Communities and Bacterial Nitrification in Suburban Vegetable Soils. *Pedosphere*, 27(3), 482–490. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60344-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60344-8)
380. **Wang, L., Lim, C. K., Dang, H., Hanson, T. E., & Klotz, M. G.** (2016b). D1FHS, the Type Strain of the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosococcus wardiae* spec. nov.: Enrichment, Isolation, Phylogenetic, and Growth Physiological Characterization. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00512>
381. **Wang, S. T., Li, S. P., Wang, W. Q., & You, H.** (2015). The impact of zinc oxide nanoparticles on nitrification and the bacterial community in activated sludge in an SBR. *RSC Advances*, 5(82), 67335–67342. <https://doi.org/10.1039/C5RA07106B>
382. **Wang, Y., Jin, X., He, L., & Zhang, W.** (2017b). Inhibitory effect of thiourea on biological nitrification process and its eliminating method. *Water Science and Technology*, 75(12), 2900–2907. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.177>
383. **Wang, Z., Wang, Y., Gong, F., Zhang, J., Hong, Q., & Li, S.** (2010). Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2. *Chemosphere*, 81(5), 639–644. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.040>
384. **Warnes, G. R., Bolker, B., Gorjanc, G., Grothendieck, G., Korosec, A., Lumley, T., MacQueen, D., Magnusson, A., Rogers, J & others** (2017). gdata: Various R Programming Tools for Data Manipulation. R package version 2.18.0. <https://CRAN.R-project.org/package=gdata>
385. **Wickham, H et al.**, (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open-Source Software*, 4(43), 1686, <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
386. **Wickham, H & Seidel, D.** (2020). scales: Scale Functions for Visualization. R package version 1.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=scales>
387. **Wickham, H. & Henry, L.** (2020). tidyr: Tidy Messy Data. R package version 1.1.0. <https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>
388. **Wickham, H.** (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 40(1), 1-29. URL <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>.
389. **Wickham, H.** (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
390. **Wickham, H.** (2019). stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations. R package version 1.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=stringr>
391. **Wickham, H., François, R., Henry, L. & Müller, K.** (2020). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.2. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
392. **Witte, C.-P.** (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180(3), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.010>
393. **Woelfenden, H. C., Gates, A. J., Bocking, C., Blyth, M. G., Richardson, D. J., & Moulton, V.** (2013). Modeling the effect of copper availability on bacterial denitrification. *MicrobiologyOpen*, 2(5), 756–765. <https://doi.org/10.1002/mbo3.111>

- 394. Woznica, A., Nowak, A., Ziemiński, P., Kwasniewski, M., & Bernas, T. (2013).** Stimulatory Effect of Xenobiotics on Oxidative Electron Transport of Chemolithotrophic Nitrifying Bacteria Used as Biosensing Element. *PLoS ONE*, 8(1), e53484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053484>
- 395. Wu, F., Harper, B. J., Crandon, L. E., & Harper, S. L. (2020).** Assessment of Cu and CuO nanoparticle ecological responses using laboratory small-scale microcosms. *Environmental Science: Nano*, 7(1), 105–115. <https://doi.org/10.1039/c9en01026b>
- 396. Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011).** Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*, 2011, 1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
- 397. Xiao, Y., Vijver, M. G., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2018).** Impact of water chemistry on the behavior and fate of copper nanoparticles. *Environmental Pollution*, 234, 684–691. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.015>
- 398. Xie, Y. (2014)** knitr: A Comprehensive Tool for Reproducible Research in R. In Victoria Stodden, Friedrich Leisch and Roger D. Peng, editors, *Implementing Reproducible Computational Research*. Chapman and Hall/CRC. ISBN 978-1466561595
- 399. Xie, Y. (2015)** Dynamic Documents with R and knitr. 2nd edition. Chapman and Hall/CRC. ISBN 978-1498716963
- 400. Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., & Gan, Y. (2011).** Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. *ISRN Ecology*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.5402/2011/130289>
- 401. Yang, Z., Jiang, W., Wang, X., Cheng, T., Zhang, D., Wang, H., ... Hong, Q. (2018).** An Amidase Gene, ipaH, Is Responsible for the Initial Step in the Iprodione Degradation Pathway of *Paenarthrobacter* sp. Strain YJN-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-18>
- 402. Yenjerla, M., Cox, C., Wilson, L., & Jordan, M. A. (2009).** Carbendazim Inhibits Cancer Cell Proliferation by Suppressing Microtubule Dynamics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2), 390–398. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.143537>
- 403. Yepsen, D. V., Levipan, H. A., & Molina, V. (2019).** *Nitrospina* bacteria in a rocky intertidal habitat (Quintay Bay, central Chile). *MicrobiologyOpen*, 8(3), e00646. <https://doi.org/10.1002/mbo3.646>
- 404. Yin, Z., Bi, X., & Xu, C. (2018).** Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA) Play with Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB) in Nitrogen Removal from Wastewater. *Archaea*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/8429145>
- 405. Yoon, S.-J., Kwak, J. II, Lee, W.-M., Holden, P. A., & An, Y.-J. (2014).** Zinc oxide nanoparticles delay soybean development: A standard soil microcosm study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.014>
- 406. Yu, R., Wu, J., Liu, M., Chen, L., Zhu, G., & Lu, H. (2016).** Physiological and transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to TiO₂ and ZnO nanoparticles and their mixtures. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13023–13034. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6469-8>
- 407. Yuan, Z., Li, J., Cui, L., Xu, B., Zhang, H., & Yu, C.-P. (2013).** Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria. *Chemosphere*, 90(4), 1404–1411. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.032>
- 408. Zabaloy, M. C., Allegrini, M., Tebbe, D. A., Schuster, K., & Gomez, E. del V. (2017).** Nitrifying bacteria and archaea withstanding glyphosate in fertilized soil microcosms. *Applied Soil Ecology*, 117–118, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.012>

409. **Zeng**, Y., Tian, S., & Pan, Y. (2018). Revealing the Sources of Atmospheric Ammonia: a Review. *Current Pollution Reports*, 4(3), 189–197. <https://doi.org/10.1007/s40726-018-0096-6>
410. **Zhai**, Y., Hunting, E. R., Liu, G., Baas, E., Peijnenburg, W. J. G. M., & Vijver, M. G. (2019). Compositional alterations in soil bacterial communities exposed to TiO₂ nanoparticles are not reflected in functional impacts. *Environmental Research*, 178, 108713. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108713>
411. **Zhang**, H., Zhang, Q., Miao, C., & Huang, Q. (2018). Degradation of 2, 4-dichlorophenol in aqueous solution by dielectric barrier discharge: Effects of plasma-working gases, degradation pathways and toxicity assessment. *Chemosphere*, 204, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.052>
412. **Zhang**, J., Müller, C., & Cai, Z. (2015). Heterotrophic nitrification of organic N and its contribution to nitrous oxide emissions in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 199–209.
413. **Zhang**, M., Wang, W., Zhang, Y., Teng, Y., & Xu, Z. (2017). Effects of fungicide iprodione and nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate on soil enzyme and bacterial properties. *Science of The Total Environment*, 599–600, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.011>
414. **Zhang**, X., Chen, Z., Zhang, N., Ma, Y., Song, Y., Li, Y., & Zhang, H. (2020). Resistance to copper oxide nanoparticle and oxytetracycline of partial nitrification sludge. *Chemical Engineering Journal*, 381, 122661. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122661>
415. **Zhang**, X., Huang, Y., Harvey, P. R., Li, H., Ren, Y., Li, J., ... Yang, H. (2013). Isolation and Characterization of Carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11. *PLoS ONE*, 8(10), e74810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074810>
416. **Zhao**, L., Liu, F., Crawford, N., & Wang, Y. (2018). Molecular Regulation of Nitrate Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2039. <https://doi.org/10.3390/ijms19072039>
417. **Zheng**, X., Li, Y., Chen, D., Zheng, A., & Que, Q. (2019). Study on Analysis and Sedimentation of Alumina Nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3), 510. <https://doi.org/10.3390/ijerph16030510>
418. **Zheng**, Y., Hou, L., Liu, M., Newell, S. E., Yin, G., Yu, C., ... Liu, C. (2017). Effects of silver nanoparticles on nitrification and associated nitrous oxide production in aquatic environments. *Science Advances*, 3(8), e1603229. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603229>
419. **Zhu**, Z.-Q., Zhou, F., Li, J.-L., Zhu, F.-X., & Ma, H.-J. (2016). Carbendazim resistance in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* in China and its management. *Crop Protection*, 81, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.12.011>
420. **Zin**, M. T. (2016). Degradation of dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) by using nanoparticles of iron and iron/copper. *Main Group Chemistry*, 15, 131–138. <https://doi.org/10.3233/MGC-150192>

ANEXO I: TABLAS RESUMEN TRATAMIENTOS

Tablas de resumen de análisis estadísticos para evaluación de diferencias significativas entre tratamientos y control (test t-student).

Tabla A1. Detalles sobre los valores de p obtenidos desde las comparaciones entre control y tratamientos (CuNPs, CuONPs, CuSO₄) a diferentes concentraciones.

Concentración/valor-p	CuNPs	CuONPs	CuSO ₄
0.04 mM	0.4097	0.0922	0.0026
0.16 mM	0.002	0.0069	0.0026
0.64 mM	0.0011	0.0076	0.0026
2.56 mM	0.0011	0.0055	0.0026

Tabla A2. Detalles sobre el porcentaje de inhibición en tratamientos (CuNPs, CuONPs, CuSO₄) a diferentes concentraciones.

Concentración/% Inhibición	CuNPs	CuONPs	CuSO ₄
0.04 mM	28.46%	39.76%	96.59%
0.16 mM	84.33%	82.42%	96.87%
0.64 mM	94.62%	68.71%	96.39%
2.56 mM	94.05%	74.93%	96.81%

Tabla A3. Detalles sobre los valores de p obtenidos desde las comparaciones entre control y tratamientos (Iprodione (IPR), Carbendazim (CAR) y 2,4-D) a diferentes concentraciones.

Concentración/valor-p	IPR	CAR	2,4-D
0.04 mM	0.5733	0.7455	0.8674
0.16 mM	0.7	0.4515	0.5499
0.64 mM	0.1205	0.9238	0.9671
2.56 mM	0.0083	0.9627	0.3299

Tabla A4. Detalles sobre el porcentaje de inhibición en tratamientos con plaguicidas (Iprodione, Carbendazim, 2,4-D).

Concentración/% Inhibición	IPR	CAR	2,4-D
0.04 mM	10.91%	-10.56%	-2.95%
0.16 mM	6.78%	-23.66%	-11.26%
0.64 mM	42.60%	-2.82%	0.80%
2.56 mM	77.33%	1.69%	-19.87%

Tabla A5. Detalle sobre los valores de p obtenidos desde la comparación entre control y tratamientos de combinación (Carbendazim + CuNPs, Carbendazim + CuONPs, Carbendazim+CuSO₄) a diferentes concentraciones.

Concentración/valor-p	Car+CuNPs	Car+CuONPs	Car+CuSO ₄
0.04 mM	0.0004	0.8108	0.044
0.16 mM	0.0001	0.3075	0.0424
0.64 mM	0.0001	0.0125	0.0428
2.56 mM	0.0001	0.51	0.0429

Tabla A6. Detalles sobre el porcentaje de inhibición en los tratamientos de combinación (Carbendazim+CuNPs, Carbendazim+CuONPs, Carbendazim+CuSO₄).

Concentración/% Inhibición	Car+CuNPs	Car+CuONPs	Car+CuSO ₄
0.04 mM	89.59%	3.08%	97.05%
0.16 mM	97.06%	11.34%	98.24%
0.64 mM	97.64%	-9.57%	97.92%
2.56 mM	97.33%	-6.04%	97.82%

Tabla A7. Detalle sobre los valores de p obtenidos desde la comparación entre el control y los tratamientos de combinación (Iprodione (IPR) + CuNPs, Iprodione + CuONPs, Iprodione + CuSO₄) a diferentes concentraciones ensayadas.

Concentración/valor-p	IPR+CuNPs	IPR+CuONPs	IPR+CuSO ₄
0.04 mM	0.2535	0.2389	0.0006
0.16 mM	0.0003	0.7665	< 0.0001
0.64 mM	0.0002	0.063	< 0.0001
2.56 mM	0.0002	0.0406	< 0.0001

Tabla A8. Detalles sobre el porcentaje de inhibición en tratamientos de combinación (Iprodione (IPR) + CuNPs, Iprodione + CuONPs, Iprodione + CuSO₄) a diferentes concentraciones.

Concentración/% Inhibición	IPR+CuNPs	IPR+CuONPs	IPR+CuSO ₄
0.04 mM	-11.39%	22.75%	90.38%
0.16 mM	94.41%	6.12%	98.32%
0.64 mM	97.91%	30.02%	98.62%
2.56 mM	98.13%	57.05%	97.71%

Tabla A9. Detalles sobre los valores de p obtenidos desde la comparación entre tratamientos de derivados químicos de plaguicidas (Catecol (CAT), 3,5-dicloroanilina (3,5-D) and 2,4-diclorofenol (2,4-DF)) vs control a diferentes concentraciones.

Concentración/valor-p	CAT	3,5-D	2,4-DF
0.04 mM	0.1797	0.0059	0.638
0.16 mM	< 0.0001	< 0.0001	0.0241
0.64 mM	0.0002	< 0.0001	0.0033
2.56 mM	0.0042	< 0.0001	0.0006

Tabla A10. Detalles sobre los porcentajes de inhibición entre el control y los derivados químicos de plaguicidas (Catecol (CAT), 3,5-dicloroanilina (3,5-D) and 2,4-diclorofenol (2,4-DF)) a diferentes concentraciones.

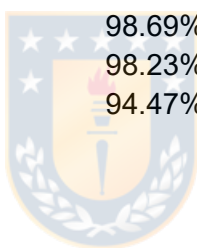
Concentración/% Inhibición	CAT	3,5-D	2,4-DF
0.04 mM	14.48%	61.58%	-8.64%
0.16 mM	55.58%	98.69%	57.59%
0.64 mM	63.33%	98.23%	77.97%
2.56 mM	70.28%	94.47%	96.85%

Tabla A11. Detalles sobre los valores de p obtenidos desde la comparación entre control y tratamientos de combinación de nanopartículas de cobre y derivados químicos de plaguicidas (Catecol (CAT), 3,5-dicloroanilina (3,5-D) and 2,4-diclorofenol (2,4-DF)) a diferentes concentraciones.

Concentración/valor-p	CAT+CuNPs	3,5-D+CuNPs	2,4-DF+CuNPs	2,4-D+CuNPs
0.04 mM	< 0.0001	0.0022	< 0.0001	0.0197
0.16 mM	< 0.0001	0.0021	< 0.0001	0.0198
0.64 mM	0.0003	0.0022	< 0.0001	0.0194
2.56 mM	0.0442	0.0025	< 0.0001	0.0191

Tabla A12. Detalles sobre los porcentajes de inhibición obtenidos desde los tratamientos de combinación de derivados químicos de plaguicidas (Catecol (CAT), 3,5-dicloroanilina (3,5-D) and 2,4-diclorofenol (2,4-DF)) y CuNPs, a diferentes concentraciones.

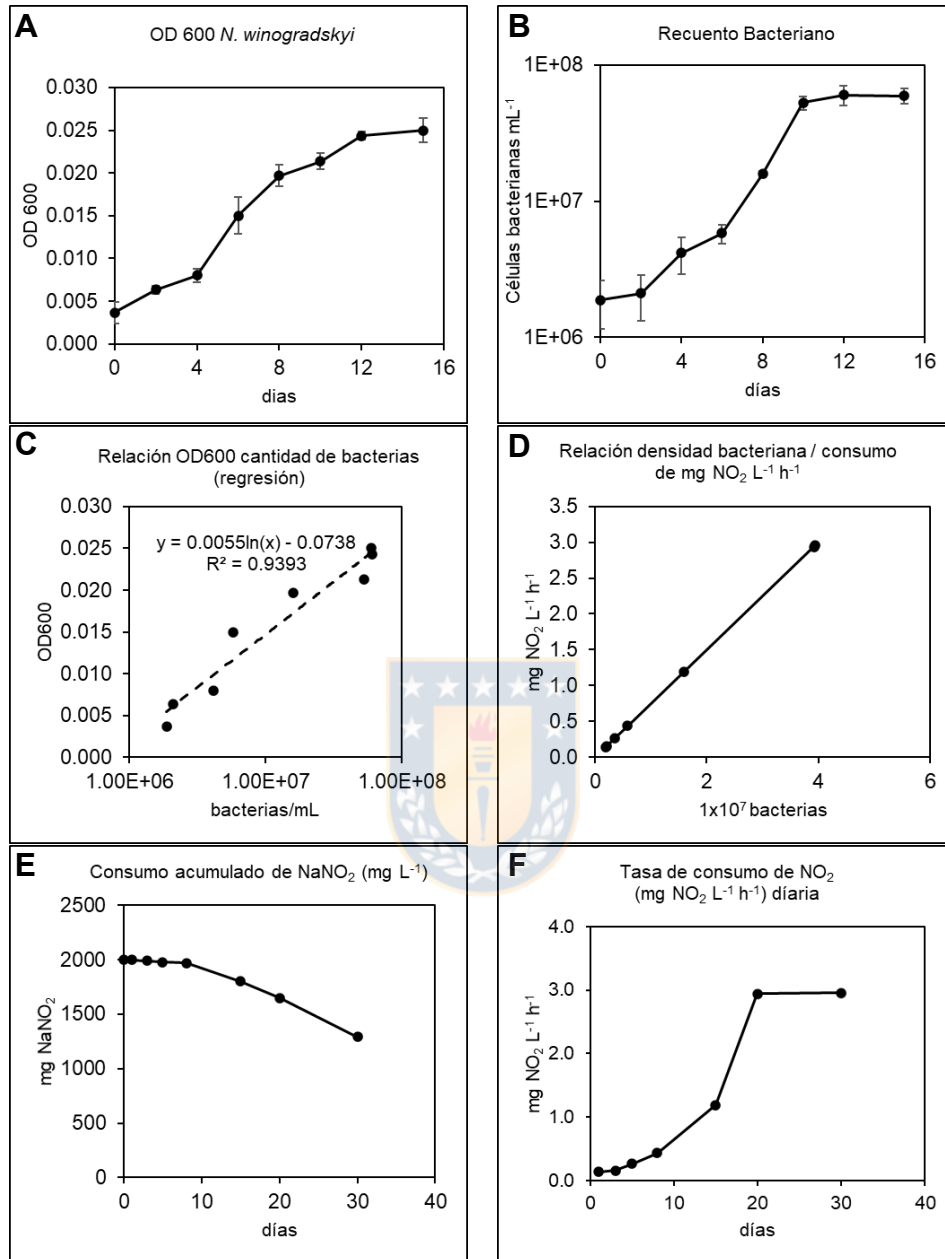
Concentración/% Inhibición	CAT+CuNPs	3,5-D+CuNPs	2,4-DF+CuNPs	2,4-D+CuNPs
0.04 mM	97.76%	98.07%	98.10%	96.64%
0.16 mM	98.60%	98.69%	98.91%	96.55%
0.64 mM	76.04%	98.23%	98.86%	97.15%
2.56 mM	57.84%	94.47%	98.65%	97.62%



A1.1 Formulas obtenidas desde regresión polinomial (estimación de IC₅₀).

NPCu		$3.635931037*(10^{-1})*x^2 - 1.119735092*x + 5.055159749*(10^{-1})$
NPCuO		$1.064628357*(10^{-2})*x^2 - 1.039189681*(10^{-1})*x + 4.537926635*(10^{-1})$
CuSO4		$6.020968557*(10^{-4})*x^2 - 4.435416769*(10^{-3})*x + 1.602650529*(10^{-2})$
CARNPCu		$6.261160928*(10^{-2})*x^2 - 0.192968653*x + 9.687263364*(10^{-2})$
CARNPCuO		$1.102429572*(10^{-1})*x^2 - 3.598329827*(10^{-1})*x + 1.068198307$
CARCuSO4		$2.091339874*(10^{-1})*x^2 - 6.418845918*(10^{-1})*x + 2.919807369*(10^{-1})$
IPRNPCu		$6.788900776*(10^{-1})*x^2 - 2.105822977*x + 9.558514571*(10^{-1})$
IPRNPCuO		$-2.693481966*(10^{-1})*x^2 + 6.663914372*(10^{-1})*x + 9.945116296*(10^{-1})$
IPRNPCuSO4		$1.303785835*(10^{-1})*x^2 - 4.012980917*(10^{-1})*x + 1.916425121*(10^{-1})$
CAR		$-1.477286387*(10^{-1})*x^2 + 3.488463666*(10^{-1}) x + 1.207333021$
IPR		$9.268295548*(10^{-2})*x^2 - 5.247445607*(10^{-1}) x + 1.071590806$
24D		$-1.974063445*(10^{-2})*x^2 + 2.737891402*(10^{-3}) x + 9.591360368*(10^{-1})$
35DCA		$0.649188452*x^2 - 2.050250678*x + 1.127766762$
CAT		$1.232603215*(10^{-1})*x^2 - 7.385477338*(10^{-1}) x + 1.081918297$
24DF		$2.443943831*(10^{-2})*x^2 - 4.799367775*(10^{-1}) x + 1.082940628$
NPCu24D		$0.143700751*x^2 - 4.417765187*(10^{-1}) x + 2.054939445*(10^{-1})$
NPCu35DCA		$-3.048386403*(10^{-2})*x^2 + 1.370715253*(10^{-1}) x + 1.75751588*(10^{-2})$
NPCuCAT		$3.590139437*(10^{-1})*x^2 - 1.315258541*x + 1.029938094$
NPCu24DF		$1.456744175*(10^{-1})*x^2 - 4.493380079*(10^{-1}) x + 2.144797792$

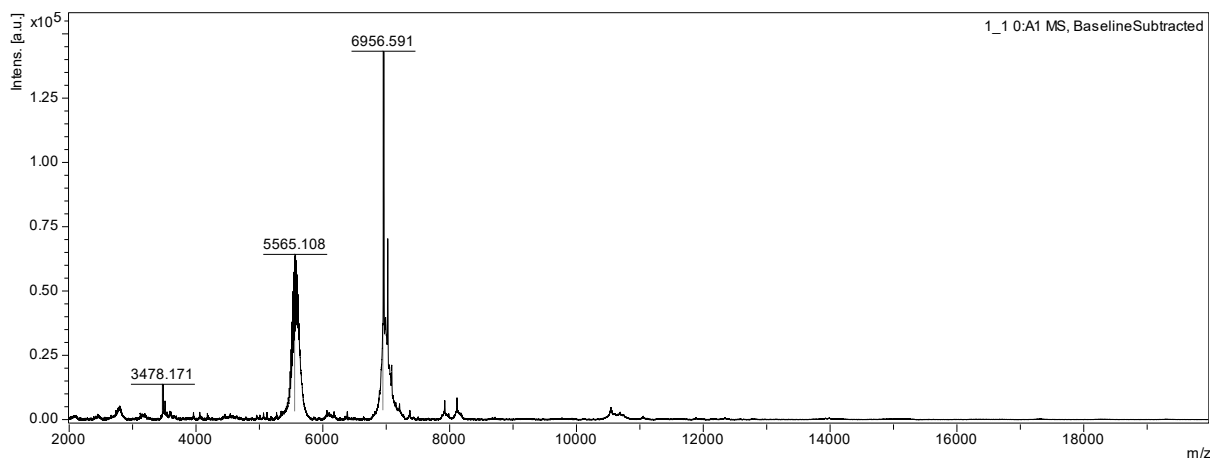
A1.2 Gráficos de monitoreo y medición de concentración de nitritos en solución madre de *N. winogradskyi*.



Nota: **A.** densidad óptica (OD 600 nm) para cultivo de *N. winogradskyi* (solución madre). **B.** Recuento bacteriano de cultivo de *N. winogradskyi*. **C.** Relación entre cantidad de bacterias y densidad óptica. **D.** Relación densidad bacteriana y consumo de nitritos (mg NO₂ L⁻¹h⁻¹). **E.** Consumo acumulado de NaNO₂ (mg L⁻¹). **F.** Variación en la tasa de consumo de NO₂ diaria.

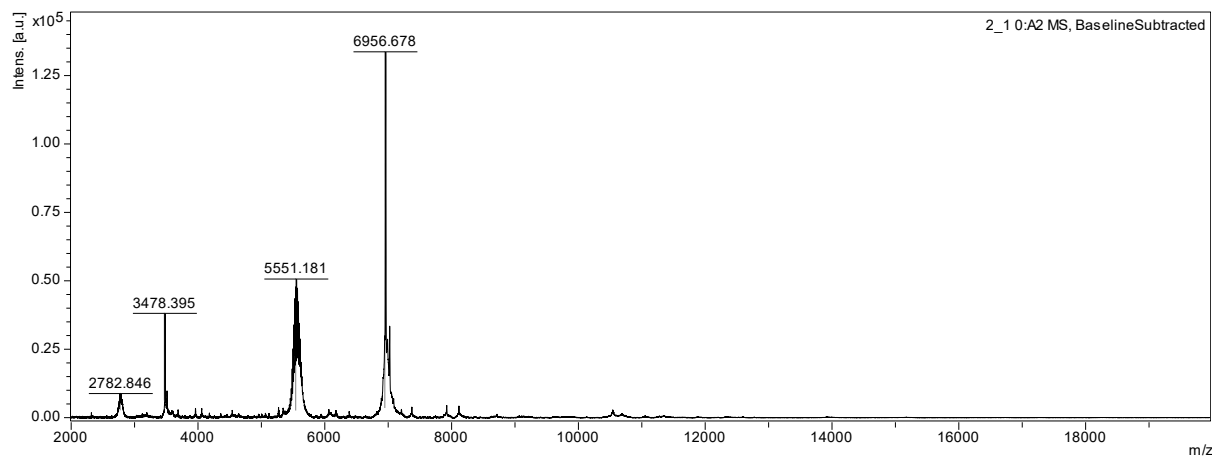
ANEXO II: DETALLES RESULTADOS MALDI TOF/TOF MS

A2.0 Otros resultados MALDI-TOF. Detalle de resultados (muestras individuales).



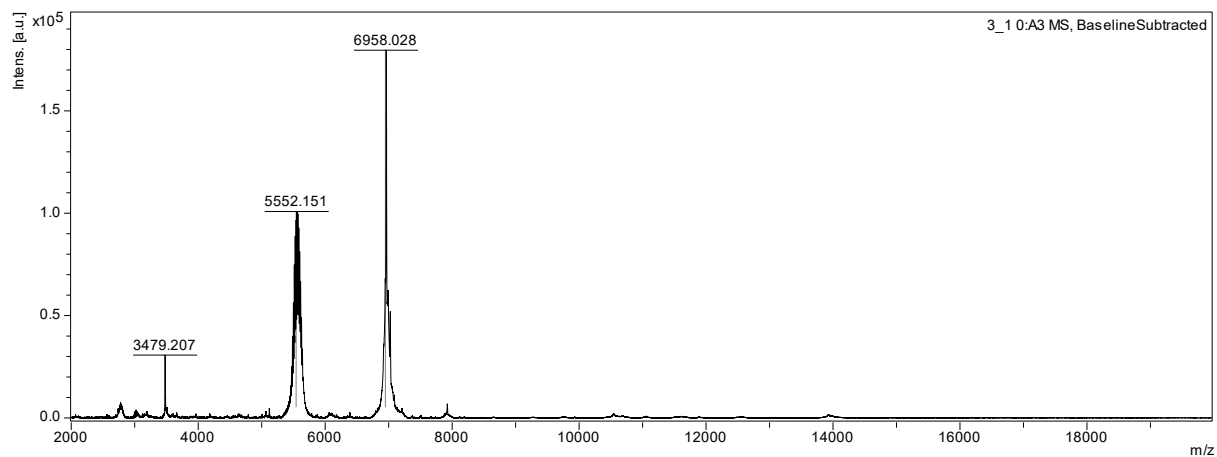
m/z	S/N	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
3478.171	6	3578	743	2055	42868
5495.263	7	1403	1153	1047	27259
5509.220	9	1609	1178	1389	35492
5523.644	12	1545	1156	1983	51791
5537.554	17	662	1158	2500	65414
5551.748	19	636	1159	2897	76005
5565.108	20	305	1160	2941	77339
5579.057	19	242	1162	2824	74364
5593.110	17	203	1163	2490	65775
5606.963	13	162	1165	2075	54938
5621.107	9	126	1166	1418	37596
6942.681	11	4.90	1296	893	29800
6956.591	39	47.4	1297	3402	113697
6983.499	11	3.44	1299	948	31748
7019.217	17	32.6	1303	1497	50356

A2.1 Resultados individuales – análisis MALDI-TOF/TOF MS, Control.



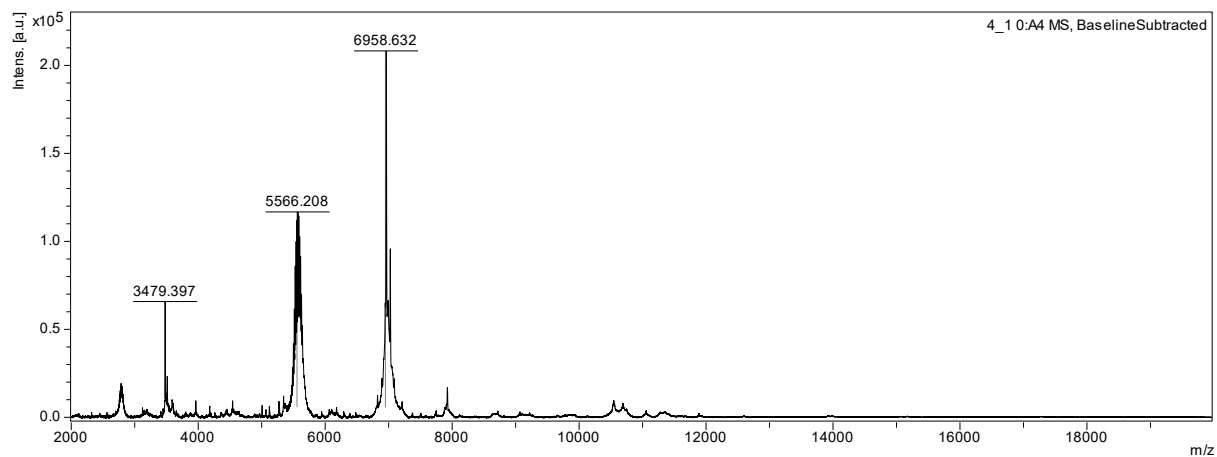
m/z	S/N	Quality Fac	Res.	Intens.	Area
2768.185	6	306	777	2125	27098
2775.797	7	2627	593	1952	34747
2782.846	8	395	1187	2449	20677
2788.570	7	3054	596	1709	30511
3478.395	26	11265	772	6019	119660
3509.078	7	2602	750	1407	29372
5495.482	8	2607	1153	997	25944
5509.749	12	1495	1155	1473	38398
5523.778	17	1256	1156	2016	52680
5537.838	20	1098	1158	2287	59818
5551.181	22	449	1159	2373	62250
5565.188	18	367	1160	2223	58458
5579.235	16	360	1162	1931	50843
5593.283	12	253	1163	1496	39514
5607.623	9	390	1165	1147	30372
5621.175	6	191	1166	689	18262
6942.066	11	7.10	1295	788	26277
6956.678	49	91.6	1297	3273	109381
7018.921	10	45.4	1303	695	23360

A2.2 Resultados individuales – análisis MALDI-TOF/TOF MS, CuONPs.



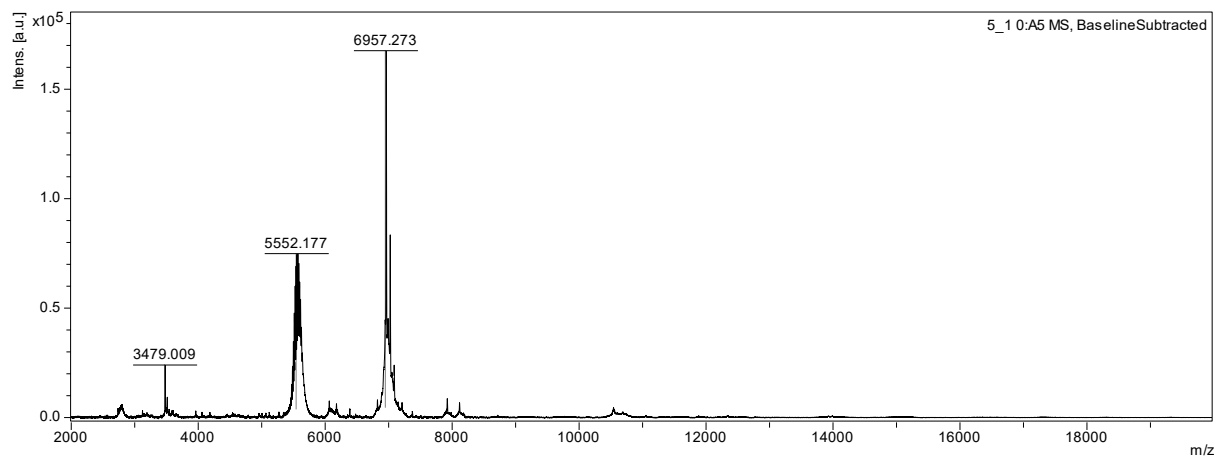
m/z	S/N	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
3479.207	18	9755	760	4855	98446
5467.888	7	706	1150	994	25752
5482.340	12	2068	1186	1656	41631
5496.167	15	1641	1153	2218	57734
5510.597	24	848	1155	3256	84875
5524.907	31	758	1156	4195	109609
5538.616	37	512	1158	4709	123290
5552.151	38	315	1159	4951	129900
5566.101	37	268	1161	4847	127454
5580.268	31	290	1162	4440	116915
5594.333	27	263	1163	3675	97077
5608.602	24	396	1199	2828	72774
5622.363	13	207	1166	1766	46828
5636.359	11	174	1168	1292	34336
5649.512	6	83.2	1169	815	21693
6943.138	24	3.61	1296	1940	64739
6958.028	62	18.9	1297	4859	162406
6972.957	20	2.51	1298	1548	51802
7020.265	14	17.7	1303	1100	37003

A2.3 Resultados individuales – análisis MALDI-TOF/TOF MS, Carbendazim



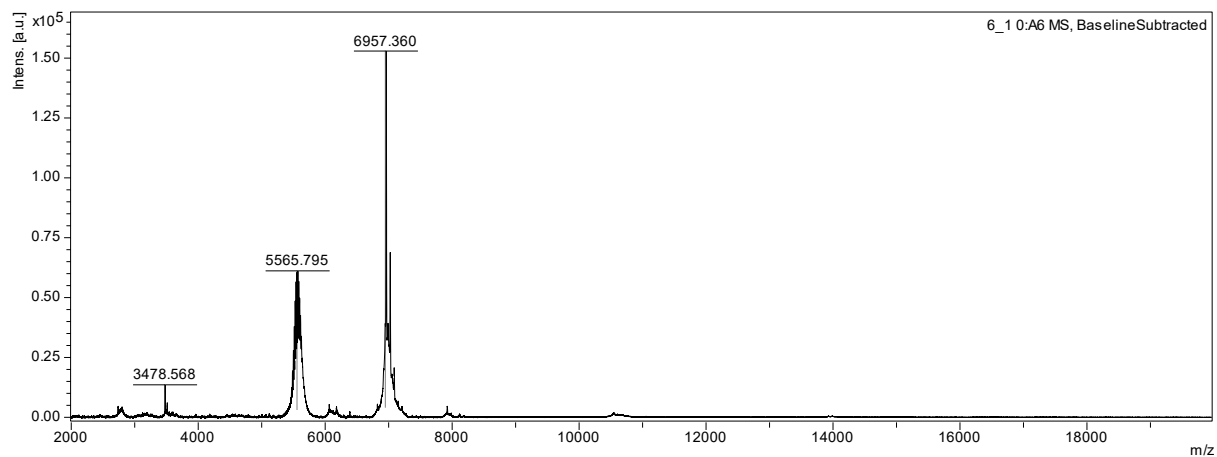
m/z	S/N	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
3479.397	22	3821	864	10473	191724
5510.543	8	2881	1189	2374	59943
5524.639	12	963	1156	3618	94513
5539.024	14	895	1164	4499	117040
5552.765	17	595	1159	5249	137737
5566.208	19	280	1161	5462	143640
5580.244	16	233	1162	5385	141798
5594.421	16	197	1163	4772	126063
5608.494	14	224	1165	4079	108008
5622.409	9	173	1166	2775	73576
5673.111	6	114	4936	1382	8258
6944.168	9	4.61	1296	1592	53114
6958.632	29	36.4	1297	5326	178017
6985.134	8	4.95	1299	1488	49874
7020.755	10	34.5	1303	1999	67241

A2.4 Resultados individuales – análisis MALDI-TOF/TOF MS, Iprodiona.



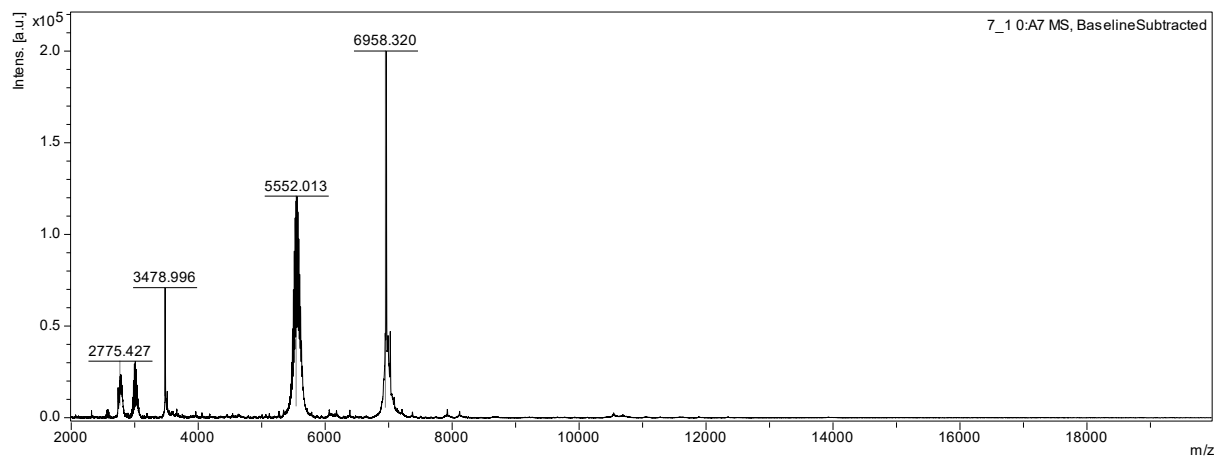
m/z	S/N	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
3479.009	13	3408	795	3689	71730
5481.808	6	2453	1152	946	24576
5496.086	9	4250	1259	1465	34264
5510.321	11	6405	1240	1902	45267
5524.169	16	2735	1156	2472	64571
5538.418	20	2005	1158	3044	79628
5552.177	24	777	1159	3401	89229
5565.742	23	307	1160	3400	89398
5579.873	23	252	1162	3193	84086
5593.966	18	201	1163	2729	72079
5607.769	16	165	1165	2253	59651
5621.676	10	122	1166	1584	42005
5636.010	7	72.4	1168	936	24864
6942.837	12	4.98	1296	1088	36313
6957.273	45	44.2	1297	4178	139625
6973.943	9	5.72	1434	890	26217
6985.640	12	10.0	1300	1018	34105
6999.309	9	3.36	1301	714	23982
7020.108	21	56.4	1303	1780	59877

A2.5 Resultados individuales – análisis MALDI-TOF/TOF MS, CuNPs.



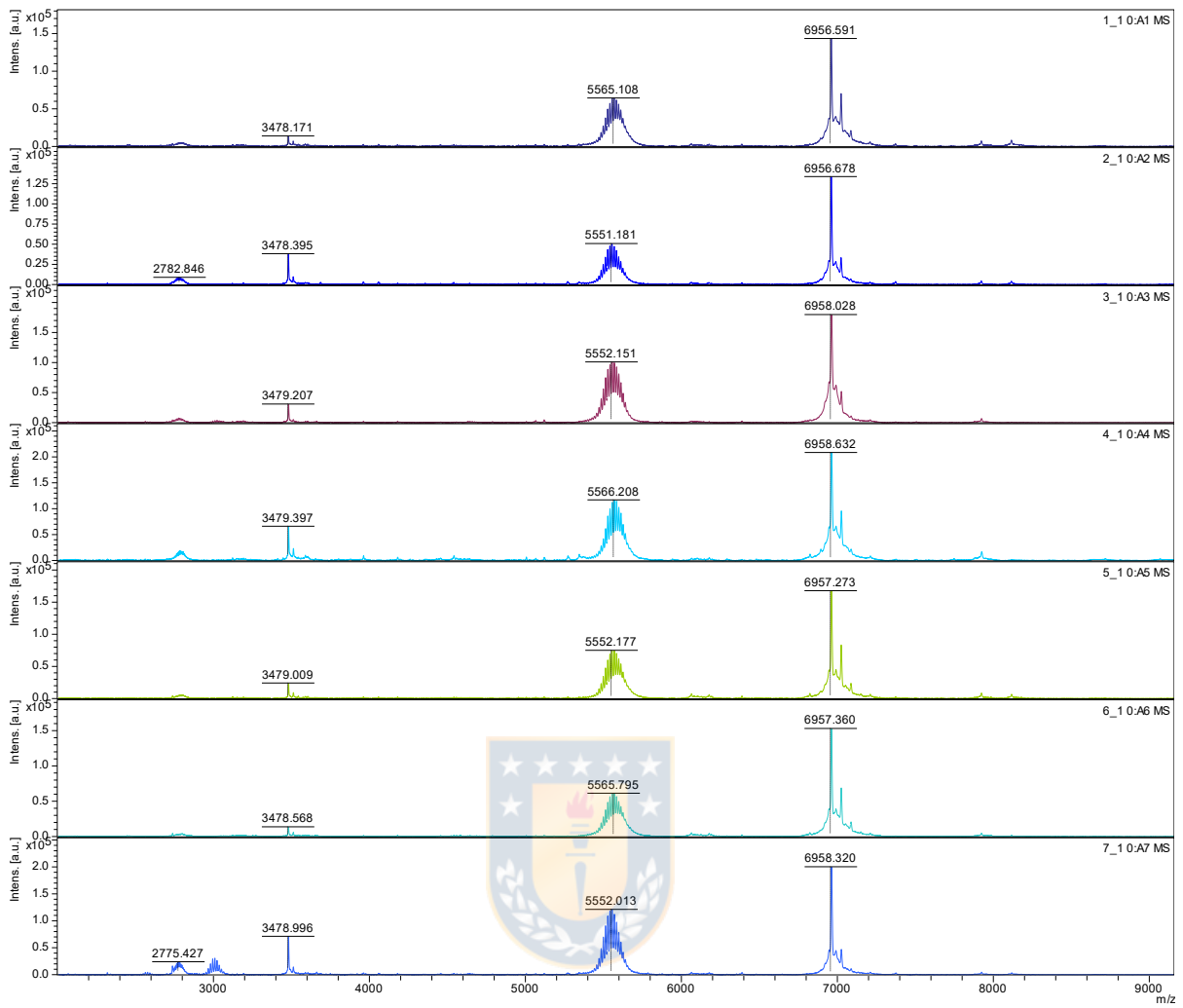
m/z	S/N	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
3478.568	9	7118	744	2070	43177
5481.629	6	819	1152	765	19866
5496.198	10	1597	1220	1136	27642
5509.860	12	1258	1155	1418	36955
5524.440	17	1192	1156	2032	53080
5538.575	23	1019	1158	2553	66796
5552.209	26	624	1159	2787	73112
5565.795	26	314	1160	2811	73928
5579.878	25	257	1162	2606	68621
5593.979	19	197	1163	2224	58750
5607.850	17	169	1165	1804	47772
5621.485	12	133	1166	1265	33540
5635.369	7	72.7	1168	795	21119
6917.742	6	3.15	1297	382	12674
6942.624	17	4.69	1296	974	32513
6957.360	61	43.5	1297	3725	124477
6985.419	15	3.99	1300	921	30863
7020.074	25	38.4	1303	1484	49919
7082.446	7	31.6	1308	358	12132

A2.6 Resultados individuales – análisis MALDI-TOF/TOF MS, Iprodiona + CuNPs.

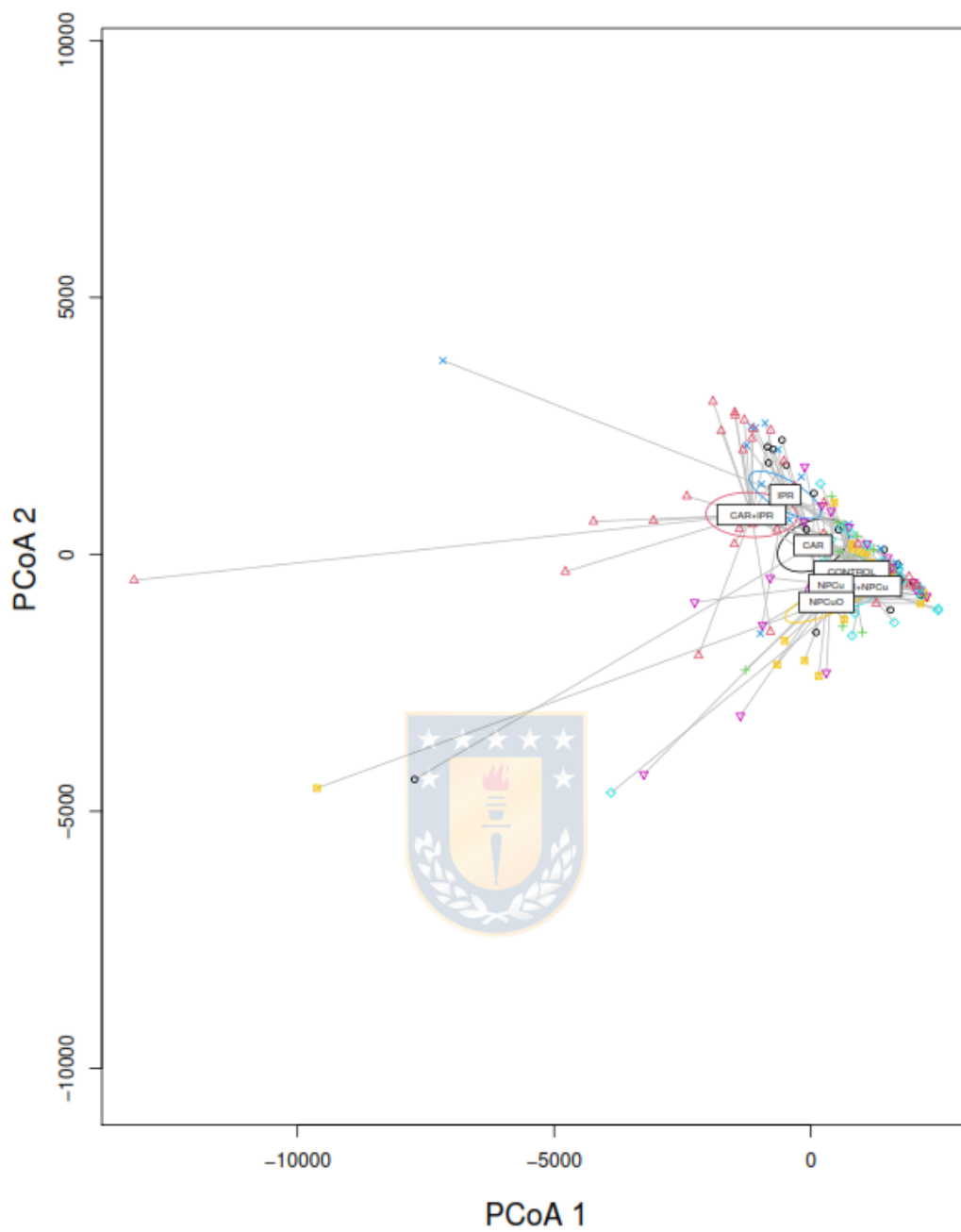


m/z	S/N	Quality Fac.	Res.	Intens.	Area
2735.797	10	1549	585	4039	71305
2754.424	7	458	778	4025	50857
2761.530	9	430	780	5279	66790
2768.376	10	363	782	5830	73892
2775.427	11	498	780	6320	80604
2782.934	13	2922	595	5402	96331
2790.253	12	295	1148	5640	49382
2795.721	9	968	598	4048	72386
2804.598	7	667	599	2967	53149
2978.867	10	2073	670	4001	71310
2992.953	15	4856	640	5835	109159
3006.861	16	3790	643	6182	116029
3020.890	14	2122	646	5310	99992
3034.610	9	1275	649	3641	68785
3478.996	32	11142	785	11409	221859
5467.881	8	827	1169	1275	32493
5482.461	12	2713	1308	2270	50328
5496.488	19	4056	1153	2879	74950
5510.492	24	1803	1155	4148	108150
5524.294	34	708	1156	5231	136672
5538.597	38	768	1158	5788	151548
5552.013	35	331	1159	5874	154123
5566.072	34	287	1161	5399	141976
5580.194	30	270	1162	4527	119221
5594.322	20	247	1163	3403	89909
5608.574	16	310	1165	2366	62657
5622.171	10	155	1166	1545	40957
5636.185	7	85.2	1168	1103	29306
6942.734	12	3.74	1296	1224	40827
6958.320	51	51.2	1305	5144	170595
6975.630	10	2.81	1299	987	33028
7020.605	12	29.2	1303	1002	33691

A2.7 Resultados individuales – análisis MALDI-TOF/TOF MS, Carbendazim + CuNPs.



A2.8 Resultados – análisis MALDI-TOF, Detalle principales *peaks*.



A2.9 Resultados análisis PERMANOVA para perfiles MALDI-TOF MS/MS, método euclidiano.

ANEXO III: ANALISIS UNIPROT

CAR	Entry	Entry.name	Protein.name	Gene
3479	A0A4Y3WIE9	A0A4Y3WIE9_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_35610
5468	A0A4Y3WC03	A0A4Y3WC03_NITWI	Cytochrome c oxidase subunit IV	NWI01_23460
5482	A0A4Y3WF91	A0A4Y3WF91_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_27130
5496	A0A4Y3WCD6	A0A4Y3WCD6_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_25840
5511	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_33710
5525	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_33710
5539	Q3SPT1	Q3SPT1_NITWN	Uncharacterized protein	Nwi_2457
5552	Q3SPF4	Q3SPF4_NITWN	Uncharacterized protein	Nwi_2584
5566	A0A4Y3WGT7	A0A4Y3WGT7_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_32120
5580	A0A4Y3WK10	A0A4Y3WK10_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_35680
5594	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_27870
5609	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_27870
5622	Q3SNX2	Q3SNX2_NITWN	Uncharacterized protein	Nwi_2766
5636	A0A4Y3WAU1	A0A4Y3WAU1_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_20490
5650	A0A4Y3W7M9	A0A4Y3W7M9_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_08860
6943	Q3SV96	Q3SV96_NITWN	Uncharacterized protein	Nwi_0528
6958	A0A4Y3WEN0	A0A4Y3WEN0_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_15880
6973	A0A4Y3WBN6	A0A4Y3WBN6_NITWI	Uncharacterized protein	NWI01_17700
7020	Q3SPF0	Q3SPF0_NITWN	Uncharacterized protein	Nwi_2588

Species	Length	Sequence	Calculated.Mass	Monoisotopic.Mass	Isoelectric.Point
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	42	MDAALIQQCADPNLKPAAIEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	50	MSDHSEIVYSTADGMDYPAHENTYNTFKIFGTIGSVAVIIVVSLMAIFLT	5471.194	5467.671	4.225549
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	50	MKEAGNEGFMIALQKHGFAGSGAFHKDIKNSGVWSAIDVVTKQDYQRSI	5482.17	5478.761	9.165677
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	50	MQQRSDTRVTVNARGLTEQTVLRLQTFALYGLSLVIAAVVFGSLGIHPF	5491.285	5487.945	9.347669
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)	50	MTDLHLGRPNRGGVEDMRGIVPEEQNYAIGWTLAFLTLVSVGVVWTFGF	5538.275	5534.791	4.66497
Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)	51	MVITAAHIQPIVALIAGVLLLLMPRFLNLLVAVYLVFVGLSLGVLKMLHF	5547.944	5544.249	10.45513
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	51	MEGTRLRGGGRLCRERPESFLVPREGSALSNDPGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	52	MLAVCMIGLDLAKNVFQAHAVDASGADLFRKLRGQVLAFFTALPACTVAM	5582.612	5578.89	8.239544
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	51	MLISVLITFFIVVLYFISVAPLDIRGKQIARVAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	51	MLISVLITFFIVVLYFISVAPLDIRGKQIARVAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)	51	MFISVLITFFIVVLYFISVAPLDIRGKQIARVAIVIGVASALRFVPMF	5626.935	5623.273	11.4308
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	51	MDMSRPYVPSWPGKSAKRVALAAPPNSDFLESQDQVDARNNPGMTAMFE	5633.245	5629.616	4.401677
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	47	MDIEFLKQQAERCRLAKGTDPFTEKRLKLAEEYEYARVKELERRGP	5649.468	5646.004	9.307171
Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)	66	MNHSIYSADRTTHLKIIVVALVAGIAGFAISARMNADDGTYQTARIKAGKPMAVTSSDAMVVR	6934.013	6929.629	10.31935
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	63	MIPAESAPIMTSAETIAGNITLIFAIIRILPMQVLPINRSLIESQSLIWSLSKMSQDVVL	6955.315	6950.817	6.647179
Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	61	MKDTREWAEKLRTEAEERLISKLATNLEKRETFARLAETIDRQAAELEGLIASGNLPEPK	6971.841	6967.629	4.828015
Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)	62	MPPLIALAATLGGVLAVRWLYNTARRINQEELEARMARVAEPARRIDIPLRRDSRTGAYRPD	7017.03	7012.773	11.53345

A3.1 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, tratamiento Carbendazim.

CAR.NPCu	Entry	Entry.name	Status	Protein.name	Gene	Species
2736	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2754	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2762	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2768	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2775	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2783	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2790	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2796	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2805	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreview	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2979	A0A4Y3W	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
2993	A0A4Y3W	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
3007	A0A4Y3W	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
3021	A0A4Y3W	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
3035	A0A4Y3W	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
3479	A0A4Y3W	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5468	A0A4Y3W	A0A4Y3WC03_NITWI	unreview	Cytochrome c oxidase subunit IV	NWI01_23460	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5482	A0A4Y3W	A0A4Y3WF91_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_27130	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5496	A0A4Y3W	A0A4Y3WCD6_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_25840	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5510	A0A4Y3W	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5524	A0A4Y3W	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5539	Q3SPT1	Q3SPT1_NITWN	unreview	Uncharacterized protein	Nwi_2457	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5552	Q3SPF4	Q3SPF4_NITWN	unreview	Uncharacterized protein	Nwi_2584	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5566	A0A4Y3W	A0A4Y3WGT7_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_32120	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5580	A0A4Y3W	A0A4Y3WK10_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_35680	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5594	A0A4Y3W	A0A4Y3WE30_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5609	A0A4Y3W	A0A4Y3WE30_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
5622	Q3SNX2	Q3SNX2_NITWN	unreview	Uncharacterized protein	Nwi_2766	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5636	A0A4Y3W	A0A4Y3WAU1_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_20490	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
6943	Q3SV96	Q3SV96_NITWN	unreview	Uncharacterized protein	Nwi_0528	Nitrobacter winogradskiyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
6958	A0A4Y3W	A0A4Y3WENO_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_15880	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
6976	A0A4Y3W	A0A4Y3WDK4_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_30040	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)
7021	A0A4Y3W	A0A4Y3W860_NITWI	unreview	Uncharacterized protein	NWI01_10760	Nitrobacter winogradskiyi (Nitrobacter agilis)

A3.2.1 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, tratamiento Carbendazim + CuNPs.

Length	Sequence	Calculated.Mass	Monoisotopic.Mass	Isoelectric.Point
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
42	MDAALIQQCADPNLKPAIAEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
42	MDAALIQQCADPNLKPAIAEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
42	MDAALIQQCADPNLKPAIAEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
42	MDAALIQQCADPNLKPAIAEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
42	MDAALIQQCADPNLKPAIAEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
42	MDAALIQQCADPNLKPAIAEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
50	MSDHSEIVYSTADGMDYPAHENTYNTFIKFGTIGSVAVIIVVSLMAIFLT	5471.194	5467.671	4.225549
50	MKEAGNEGFMIALQKHGFAGSGAFHKDIKNSLGSVWSAIDVVTQKDYQRSI	5482.17	5478.761	9.165677
50	MQQRSDTRVTVNARGLTEQTVLRLQTFALYGSVLVIAAVVFGSLGIHPF	5491.285	5487.945	9.347669
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
50	MTDLHLGRPNRGGVEDMRGIVPEEQNYAIGWTLAFLTSLVVGVVWTFGF	5538.275	5534.791	4.66497
51	MVITAAHIQPIVALIAGVLIILLMPRFLNLLVAVYLIFVGLSGLGVFKMLHF	5547.944	5544.249	10.45513
51	MEGTRLRGGGRLCRERPESFLVPREGSALSNDPGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
52	MLAVCMIGLDLAKNVFQAHAVDASGADLFREKLRRGQVLAFFTALPACTVAM	5582.612	5578.89	8.239544
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MFISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5626.935	5623.273	11.4308
51	MDMSRPYVPSWPGKSAKRVFALAAPPNSDFLESQSDVDARNNPGMTAMFE	5633.245	5629.616	4.401677
66	MNHSIYSADRTTHLKIVVVALVAGIAGFAISARMNADGGYTQTARIKAGKPMVTSDDAMVVR	6934.013	6929.629	10.31935
63	MIPAESAPIMTSAETIAGNITLIFAFIIRILPMQVKLPINRSLLESQSLIWSLSKMSQDVVL	6955.315	6950.817	6.647179
62	MSLETGRHVYRVRIGLDLREHSSAFSRGVLDDRLFVWTAANADTKFFGSAPRWVAPNVTR	6976.812	6972.601	11.1857
65	MLIAIEIAGAVLTIYVYVGLRTIALNIRDIEMLVTHLLKMERMTTRNASADVPSTSDGNPAE	7024.172	7019.744	5.723676

A3.2.2 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, tratamiento Carbendazim + CuNPs (Continuación).

CONTROL	Entry	Entry.name	Status	Protein.name	Gene	Species	Length	
	3478	A0A4Y3WIE9	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	42
	5495	A0A4Y3WCD6	A0A4Y3WCD6_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_25840	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	50
	5509	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	52
	5524	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	52
	5538	Q3SPT1	Q3SPT1_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2457	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM	50
	5552	Q3SPF4	Q3SPF4_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2584	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM	51
	5565	A0A4Y3WGT7	A0A4Y3WGT7_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_32120	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	51
	5579	A0A4Y3WK10	A0A4Y3WK10_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35680	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	52
	5593	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	51
	5607	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	51
	5621	Q3SNX2	Q3SNX2_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2766	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM	51
	6943	Q3SV96	Q3SV96_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_0528	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM	66
	6957	A0A4Y3WENO	A0A4Y3WENO_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_15880	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	63
	6983	A0A4Y3WF12	A0A4Y3WF12_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33750	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)	63
	7019	Q3SPF0	Q3SPF0_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2588	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM	62

Sequence	Calculated.Mass	Monoisotopic.Mass	Isoelectric.Point
MDAALIQQCADPNLKPAAIEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
MQQRSDTRVTVNARGLTEQTVLRLQTFALYGLVLIAAVVFGLGIHPF	5491.285	5487.945	9.347669
MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVVYIVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVVYIVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
MTDLHLGRPNRGGVEDMRGIVPEEQNYAIGWTLAFLTLVGVVWTFGF	5538.275	5534.791	4.66497
MVITAAHIQPIVALIAGVLLIMPRFLNLLVAVYLIFVGLSGLGVFKMLHF	5547.944	5544.249	10.45513
MEGTRLRGGGRLCRERPEFLVPREGSALSNDPGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
MLAVCMIGLDLAKNVFQAHAVDASGADLFREKLRGQVLAFFALPACTVAM	5582.612	5578.89	8.239544
MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
MFISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5626.935	5623.273	11.4308
MNHSIYADRTTHLKIVVVALVAGIAGFAISARMNADDGYQTARIKAGKPMAVTSSDAMVVR	6934.013	6929.629	10.31935
MIPAESAPIMTSAETIAGNITLIFAFIIRILPMQVKLPINRSLLESQSLIWSLSKMSQDVVL	6955.315	6950.817	6.647179
MVRPRTALEAFEVRKDAQLSREVEFAIPRSGKGRVKSRAIAIGLSKARNKGQKVPKKKSS	6977.117	6972.974	12.14132
MPPLIALAATLGGLVAVRWLYNTARRINQELEEARMARVAEPARRDIPTLRDRSRTGAYRPD	7017.03	7012.773	11.53345

A3.3 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, Control.

IPR	Entry	Entry.name	Status	Protein.name	Gene	Species
3479	A0A4Y3WIE9	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5511	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5525	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5539	Q3SPT1	Q3SPT1_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2457	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5553	A0A4Y3WGT7	A0A4Y3WGT7_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_32120	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5566	A0A4Y3WGT7	A0A4Y3WGT7_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_32120	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5580	A0A4Y3WK10	A0A4Y3WK10_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35680	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5594	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5608	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5622	Q3SNX2	Q3SNX2_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2766	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5673	A0A4Y3WEA5	A0A4Y3WEA5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_28770	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6944	Q3SV96	Q3SV96_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_0528	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
6959	A0A4Y3WEN0	A0A4Y3WEN0_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_15880	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6985	A0A4Y3WF12	A0A4Y3WF12_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33750	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
7021	A0A4Y3W860	A0A4Y3W860_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_10760	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)

Length	Sequence	Calculated.Mass	Monoisotopic.Mass	Isoelectric.Point
42	MDAALIQQCADPNLKPAAIEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVVYIVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVVYIVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
50	MTDLHLGRPNRGGVEDMRGIVPEEQNYAIGWTLSAFLTLVVGVVWTFGF	5538.275	5534.791	4.66497
51	MEGTRLRGGGRLCRERPEFLVPREGSALSNDPGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
51	MEGTRLRGGGRLCRERPEFLVPREGSALSNDPGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
52	MLAVCMIGLDLAKNVFQAHAVDASGADLFREKLRRGQVLAFFALPACTVAM	5582.612	5578.89	8.239544
51	MLISVLITFFIVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MLISVLITFFIVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MFISVLITFFIVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5626.935	5623.273	11.4308
51	MSVLKVVYVYIPFLVISATIGAVLWNRKINRARASAPNKKPEDELSASD	5675.564	5672.103	10.56615
66	MNHSIYADRTHLKIIVVALVAGIAGVAGFAISARMNADDGYQTARIKAGKPMAVTSSDAMVVR	6934.013	6929.629	10.31935
63	MIPAESAPIMTSAETIAGNITLIFAFIIRILPMQVKLPINRSLIESQSLIWSLSKMSQDVVL	6955.315	6950.817	6.647179
63	MVRPRTALEAFEVRKDAQLSREVEFAIPRSGKGRVKSQKQAIAGLSKARNKGQKVPKKSS	6977.117	6972.974	12.14132
65	MLIAIEIAGAVLTGIYVGLRITIALNIRDIEMLVTHLLKMERRMTRNASADVPSTSDGNSPA	7024.172	7019.744	5.723676

A3.4 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, Tratamiento Iprodiona.

IPR.NPCu	Entry	Entry.name	Status	Protein.name	Gene	Species
3479	A0A4Y3WIE9	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5482	A0A4Y3WF91	A0A4Y3WF91_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27130	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5496	A0A4Y3WCD6	A0A4Y3WCD6_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_25840	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5510	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5524	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5539	Q3SPT1	Q3SPT1_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2457	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5552	Q3SPF4	Q3SPF4_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2584	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5566	A0A4Y3WGT7	A0A4Y3WGT7_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_32120	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5580	A0A4Y3WK10	A0A4Y3WK10_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35680	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5594	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5608	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5621	Q3SNX2	Q3SNX2_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2766	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5635	A0A4Y3WAU1	A0A4Y3WAU1_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_20490	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6918	A0A4Y3W768	A0A4Y3W768_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_03400	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6943	Q3SV96	Q3SV96_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_0528	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
6957	A0A4Y3WEN0	A0A4Y3WEN0_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_15880	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6985	A0A4Y3WF12	A0A4Y3WF12_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33750	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
7020	Q3SPF0	Q3SPF0_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2588	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
7082	Q3SUM5	Q3SUM5_NITWN	unreviewed	HIG1 domain-containing protein	Nwi_0751	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)

Length	Sequence	Calculated.Mass	Monoisotopic.Mass	Isoelectric.Point
42	MDAALIQQCADPNLKPAAIEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
50	MKEAGNEGFMIALQKHGFAGSGAFHKDIKNLSGVWSAIDVVTQKDYQRSI	5482.17	5478.761	9.165677
50	MQQRSDTRTVNARGLTEQTVLRLQTFALYGLSLVLIAAVVFGLGIHPP	5491.285	5487.945	9.347669
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYIVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYIVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
50	MTDLHLGRPNRGGVEDMRGIVPEEQNYAIGWTLSAFLTLSVVGVVWTFGF	5538.275	5534.791	4.66497
51	MVITAAHIQPIVALIAGVLIILLMPRFLNLLVAVYLIVGLSGLGVFKMLHF	5547.944	5544.249	10.45513
51	MEGTRLRGGRLCRERPEFLVPREGSALSNPDGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
52	MLAVCMIGLDLAKNVFQAHAVDASGADLFREKLRRGQVLAFFFTALPACTVAM	5582.612	5578.89	8.239544
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQJARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQJARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MFISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQJARVAAIVIGVASALRFVPMF	5626.935	5623.273	11.4308
51	MDMSRPYVPSWPGKSAKRVFALAAPPNSDFLESQSDVDARNNPGMTAMFE	5633.245	5629.616	4.401677
62	MPANRWGSVAVSAAELKTIQEVITLVVFAGFSVLYLKQPLGWNHGLGFAFVALGAFFIFHKW	6917.041	6912.66	9.866122
66	MNHSIYSADRTHLKIVVVALVAGIAGVAGFAISARMNADDGYQTARIKAGKPMAVTSSDAMVVR	6934.013	6929.629	10.31935
63	MIPAESAPIMTSAETIAGNITLIFAFIIRILPMQVKLPINRSLIISQSLIWSLSKMSQDVVL	6955.315	6950.817	6.647179
63	MVRPRTALEAFEVRKDAQLSREVEFAIPRSGKGRVRSRKAQIAIGLSKARNKGQKVPKPKSS	6977.117	6972.974	12.14132
62	MPPLIALAATLGLLVAVRWLYNTARRINQEEEARMARVAEPARRDIPTLRDSRTGAYRPD	7017.03	7012.773	11.53345
64	MTVFLSMILVPVAVASVAAVLMMGLVNMRRGGSPNLSQKLMRWVFLQFVAIIAMVTIWMGLQ	7083.823	7078.813	12.80743

A3.5 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, Tratamiento Iprodiona + CuNPs

NPCu	Entry	Entry.name	Status	Protein.name	Gene	Species
3479	A0A4Y3WIE9	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35610	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5482	A0A4Y3WF91	A0A4Y3WF91_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27130	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5496	A0A4Y3WCD6	A0A4Y3WCD6_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_25840	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5510	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5524	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5538	Q3SPT1	Q3SPT1_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2457	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5552	Q3SPF4	Q3SPF4_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2584	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5566	A0A4Y3WGT7	A0A4Y3WGT7_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_32120	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5580	A0A4Y3WK10	A0A4Y3WK10_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_35680	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5594	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5608	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5622	Q3SNX2	Q3SNX2_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2766	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5636	A0A4Y3WAU1	A0A4Y3WAU1_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_20490	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6943	Q3SV96	Q3SV96_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_0528	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
6957	A0A4Y3WEN0	A0A4Y3WEN0_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_15880	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6974	A0A4Y3WBN6	A0A4Y3WBN6_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_17700	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6986	A0A4Y3WF12	A0A4Y3WF12_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_33750	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
6999	A0A4Y3WAA9	A0A4Y3WAA9_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWI01_14270	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
7020	Q3SPF0	Q3SPF0_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2588	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)

Length	Sequence	Calculated.Mass	Monoisotopic.Mass	Isoelectric.Point
42	MDAALIQQCADPNLKPAAIEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
50	MKEAGNEGFMIALQKHGFAGSGAFHKDIKNSLGVWSAIDVVTQKDYQRSI	5482.17	5478.761	9.165677
50	MQQRSDDRVTVNARGLTEQTVLRLQTFALYGLSLVIAAVVFGSLGIHPF	5491.285	5487.945	9.347669
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFVGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFVGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
50	MTDLHLGRPNRGGVEDMRGIVPEEQNYAIGWTLAFLTLVSVGVVWTFGF	5538.275	5534.791	4.66497
51	MVITAAHIQPIVALIAGVLILLMPRFLNLLVAVYLIFVGLSGLGVFKMLHF	5547.944	5544.249	10.45513
51	MEGTRLRGGRLCRERPEFLVPREGSALSNDPGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
52	MLAVCMIGLDLAKNVFQAHAVDASGADLFREKLRGGQLAFFTALPACTVAM	5582.612	5578.89	8.239544
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MFISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5626.935	5623.273	11.4308
51	MDMSRPVYPSWPGKSAKRVFALAAPPNSDFLESQDQVDARNNPGMTAMFE	5633.245	5629.616	4.401677
66	MNHSIYADRTTHLKIVVALVAGIAGFAISARMNADDGYQTARIKAGKPMAVTSSDAMVVR	6934.013	6929.629	10.31935
63	MIPAESAPIMTSAETIAGNITLIFAFIIRILPMQVKLPINRSLIESQSLIWSLSKMSQDVL	6955.315	6950.817	6.647179
61	MKDTREWAEKLRTEAEELRISKLATNLEKRETFARLAETIDRQAAEGLIASGNLPEPK	6971.841	6967.629	4.828015
63	MVRPRTALEAFEVRKDAQLSREVEFAIPRSKGGRVKSQRKQAIAGLSKARNKGQVPPKKSS	6977.117	6972.974	12.14132
64	MPLVPQQALSIWWLRQGDQGGKDIQGGKDTGLHPSTRPTGSRDNRLKTVGRDDIQPALPAPTA	7014.855	7010.68	10.76381
62	MPPILAAATLGGVLAVRWLYNTARRINQELEARMARVAEPARRDPTLRRDSRTGAYRPD	7017.03	7012.773	11.53345

A3.6 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, Tratamiento CuNPs

NPCuO	Entry	Entry.name	Status	Protein.name	Gene	Species
2768	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreviewed	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2776	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreviewed	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2783	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreviewed	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
2789	V6AWA4	V6AWA4_NITWN	unreviewed	Proteolysis tag peptide encoded by tmRNA Nitro_winog_Nb255 (Fragment)	tmRNA Nitro_winog_Nb255	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
3478	A0A4Y3WIE9	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_35610	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
3509	A0A4Y3WIE9	A0A4Y3WIE9_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_35610	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5495	A0A4Y3WCD6	A0A4Y3WCD6_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_25840	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5510	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5524	A0A4Y3WHU5	A0A4Y3WHU5_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_33710	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5538	Q3SPT1	Q3SPT1_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2457	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5551	Q3SPF4	Q3SPF4_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2584	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
5565	A0A4Y3WGT7	A0A4Y3WGT7_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_32120	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5579	A0A4Y3WK10	A0A4Y3WK10_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_35680	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5593	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5608	A0A4Y3WE30	A0A4Y3WE30_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_27870	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
5621	Q3SNX2	Q3SNX2_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2766	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
6942	Q3SV96	Q3SV96_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_0528	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
6957	A0A4Y3WEN0	A0A4Y3WEN0_NITWI	unreviewed	Uncharacterized protein	NWIO1_15880	Nitrobacter winogradskyi (Nitrobacter agilis)
7019	Q3SPF0	Q3SPF0_NITWN	unreviewed	Uncharacterized protein	Nwi_2588	Nitrobacter winogradskyi (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)

Length	Sequence	Calculated.Mass	Monoisotopic.Mass	Isoelectric.Point
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
12	ANDNYAPVAQAA	1204.246	1203.552	3.749972
42	MDAALIQQCADPNLKPAAIEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
42	MDAALIQQCADPNLKPAAIEKFIARAPALAILSRSPFAPVDV	4434.188	4431.381	6.425915
50	MQQRSDDTRVTVNARGLTEQTVLRLQTFALYGLSLVLIAAVVFGLGIHPF	5491.285	5487.945	9.347669
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
52	MARMEDGHIVETAMEARGAERGPTVRNVLVAGTALVIATFVVVYVYFGGGQ	5524.358	5520.847	5.669753
50	MTDLHLGRPNRGGVEDMRGIVPEEQNYAIGWTLAFLTLVSVVGVVWTFGF	5538.275	5534.791	4.66497
51	MVITAAHIQPIVALIAGVLILLMPRFLNLLVAVYLIFVGLSGLGVFKMLHF	5547.944	5544.249	10.45513
51	MEGTRLRGGGRLCRERPEFSLVPREGSALSNDPGGSFKRTPGKDPIEVLKT	5556.259	5552.885	10.47183
52	MLAVCMIGLDLAKNVFQAHAVDASGADLFREKLRGQVLAFFTALPACTVAM	5582.612	5578.89	8.239544
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MLISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5592.919	5589.288	11.4308
51	MFISVLITFFIVVLVLYFISVAPLDIRGKQIARVAAIVIGVASALRFVPMF	5626.935	5623.273	11.4308
66	MNHSIYADRTHLKVVALVAGIYVAVGFAISARMNADGGYTQTARIKAGKPMAVTSSDAMVVR	6934.013	6929.629	10.31935
63	MIPAESAPIMTSAETIAGNITLIFAFIIRILPMQVKLPINRSLLESQSLIWSLSKMSQDVVL	6955.315	6950.817	6.647179
62	MPPLIALAATLGLVAVRWLYNTARRINQELEARMARVAEPARRDIPTLRDSRTGAYRPD	7017.03	7012.773	11.53345

A3.7 Resultados análisis UNIPROT para perfiles MALDI-TOF MS/MS, Tratamiento CuONPs.

ANEXO IV: SCRIPTS EMPLEADOS.

A4.1 Análisis estadístico Scheirer-Ray-Hare, evaluación de Aditividad de Loewe y HSA.

Este *markdown* describe los procedimientos y funciones utilizados para cada análisis. Cada ejecución viene con una breve explicación sobre que representa cada hebra de código.

A4.1.1 Carga de librerías

Las librerías o paquetes son bibliotecas de código que reúnen funciones que no están disponibles de forma nativa en R. Es necesario primero instalarlos y luego cargarlos en el ambiente.

```
#generando un vector de librerías necesarias
Requiredpackages<-c("dplyr","purrr","tibble","ggplot2","stringr","tidyr",
                    "broom","scales","MASS","tidyverse","plyr","gdata",
                    "gridExtra","rgl","knitr","genride","rcompanion","BIGL"
                    "braidrm","FSA")
#cargando librerías necesarias durante la sesión
Lapply(requiredpackages, require, character.only = TRUE)
```

Una vez cargadas las librerías en el ambiente de la sesión, sus funciones estarán disponibles. La librería BRAID (Twarog *et al.*, 2017) y la librería BIGL (*Biochemically Intuitive Generalized Loewe Model*, Van Der Borcht, *et al.*, 2017) serán las librerías centrales del *script*, ya que el objetivo principal será la detección de sinergismo, aditividad o antagonismo de los distintos compuestos ensayados.

A4.1.2 Carga de función *multiplot*

Por cuestiones de almacenamiento y representación, es conveniente agrupar los resultados gráficos en paneles para su exportación hacia formatos .pdf, .png o .jpg, por lo que se definirá una función que no es nativa, la función `multiplot`:

```
#definicion
multiplot <- function(..., plotlist=NULL, file, cols=1, layout=NULL){
  library(grid)
  #creando una lista desde los argumentos y lista de gráficos
  plots <- c(list(...), plotlist)
  numPlots = length(plots)
  # Si el lienzo es NULL, entonces usar 'cols' para determinar el lienzo
  if (is.null(layout)) {
    #creando el panel
    #ncol: número de columnas de plots
    #nrow: número de filas necesarias,
    #calculadas desde el número de columnas
    layout <- matrix(seq(1, cols * ceiling(numPlots/cols)),
      ncol = cols,
      nrow = ceiling(numPlots/cols))
  }
  if (numPlots==1) {
    print(plots[[1]])
  } else {
    #configurando página
    grid.newpage()
    push.Viewport(viewport(layout = grid.layout(nrow(layout),
      ncol(layout))))
    #asignando cada gráfico a la locación correcta
    for (i in 1:numPlots) {
      #obteniendo las posiciones de la matriz i, j de las regiones que
      contienen este subplot
      matchidx <- as.data.frame(which(layout == i, arr.ind = TRUE))
      print(plots[[i]], vp = viewport(
        layout.pos.row = matchidx$row,
        layout.pos.col = matchidx$col
      ))
    }
  }
}
```

A4.1.3 Carga de Datos

Los datos a utilizar provienen desde 10 combinaciones diferentes. Cada combinación posee un control, 4 niveles de concentraciones para cada compuesto y 4 niveles de combinación en proporción 1:1. Las unidades de medida de las concentraciones están en milimolar (mM) y el efecto o actividad está normalizado con 100% = control. Posteriormente se somete a transformación numérica para ser expresado en el intervalo $0 \leq x \leq 1$. Primero se carga el archivo `.csv` (separado por comas) en formato BRAID.

```
#cargando CSV en formato BRAID desde archivo
data <- read.csv(file=~/.scripts/BRAID_form.csv", sep=",", header=T)
```

Para observar la integridad de los datos se puede consultar el inicio del objeto `data` con la función `head()`, comprobar sus propiedades con `str()`, o corroborar su herencia de clase con `class()`.

```
head(data)
str(data)
class(data)
```

El formato BRAID posee 8 columnas con encabezado que designa a la placa o experimento realizado, pocillo, compuestos 1 y 2 (*compound1* y *compound2*), concentraciones de compuestos 1 y 2 (*conc1*, *conc2*), y nivel de actividad (*act*).

Una vez confirmada la carga de datos se procede al submuestreo para agrupar los resultados de cada grupo de combinaciones.

```
# submuestreo para cada ensayo de combinación
datalist<-split(data, data$plate)
datalist
#submuestreo para extraccion de actividad
obj1<-as.list.data.frame(lapply(datalist, `[[`, "act"))
#verificando tamaño de objetos
length(obj1$`10`)
#convirtiendo a clase data.frame
obj1<-as.data.frame(obj1)
obj1[[1]]
```


En la consola, la llamada arroja el número de observaciones para cada experimento. La columna de actividad/efecto es la variable dependiente y esta será sometida a división por 100, por los requerimientos de las fórmulas usadas con posterioridad.

```
#función de normalización
norm_minmax <- function(x){
  return((x/100))
}
#normalizado en ciclos
obj2_norm<-list()
for (i in 1:10) {
  obj2_norm[i] <- as.data.frame(lapply(as.data.frame(obj1[[i]]),
  norm_minmax))
}
#verificando propiedades
str(obj2_norm[1])
```

Luego se crea un nuevo *dataframe* para incluir los datos normalizados y se asignan columnas a cada submuestra. La asignación de factores es necesaria para un correcto reconocimiento en análisis posteriores.

```
#creando dataframe para inclusion de datos
data_normaliza <- datalist
#asignando columnas
list.norm <- map(data_normaliza, as_tibble)
#reeemplazando
list.norm <- map2(list.norm, obj2_norm, ~ mutate(., act =.y))
#verificando
str(list.norm[[i]]$act)
#asignando factores
factor_cols = c("concl1", "concl2")
list.norm <- map(list.norm, ~ mutate_at(.,x, factor_cols, factor))
```

A4.1.4 Test de normalidad de datos

Primero se realizarán test de normalidad para establecer si es adecuado o no realizar un ANOVA de dos vías. Se realizaron test de Levene, Fligner y Shapiro-Wilk.

```
#Shapiro-Wilk test
Shapiro1 <-list()
for (i in 1:10){
  Shapiro1[[i]] <-shapiro.test(list.norm[[i]]$act)
}
#Fligner test / evaluación de factores aislados
Fligner1 <- lapply(list.norm[1:10], function(a){
  ff <- fligner.test(act ~ concl, data = a)
  return(ff)
})
Fligner2 <- lapply(list.norm[1:10], function(a){
  fff <- fligner.test(act ~ conc2, data = a)
  return(fff)
})
#Levene test /library(car)
Levene1 <- lapply(list.norm[1:10], function(a) {
  ooo <- leveneTest(act ~ concl * conc2, data = a)
})
#visualizando resultados
Shapiro1
Fligner1
Levene1
```

Al visualizar los resultados en la consola, se concluye que no hay normalidad, ya que el valor de p calculado es menor a 0.05. Por lo que evaluar un ANOVA de dos vías con interacción sería poco adecuado. En este caso se utilizará el test no-paramétrico de Scheirer-Ray-Hare, considerado el equivalente no-paramétrico del ANOVA de dos vías convencional.

A4.1.5 Test de Scheirer-Ray-Hare (SRH) no-paramétrico

Primero se generó una lista vacía, y luego se asigna iterativamente el resultado del test en la lista.

```
#generando lista y aplicando test
#library(rcompanion)
Scheirtest <-list()
for(i in 1:10){
  Scheirtest[[i]] <- scheirerRayHare(act ~ conc1 * conc2,
  data = list.norm[[i]])
}
Scheirtest
```

A partir de los resultados del test no-paramétrico SRH, se detectaron diferencias significativas entre los compuestos cuando se analizó el efecto de cada compuesto aislado y su interacción. El test es capaz de discriminar si los factores o sus interacciones difieren entre sí, pero no puede discriminar si existe un comportamiento antagonista o sinérgico.

A4.1.6 Construcción del modelo

El diseño experimental permitió evaluar si la interacción genera un efecto significativamente diferente (como fue demostrado con el test SRH). Sin embargo, para evaluar efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos, se deben evaluar otros modelos, como el Modelo de Aditividad de Loewe o Modelo *Highest Single Agent* - HSA.

Estos modelos brindan la capacidad de evaluar de forma estadística si existe aditividad o sinergia, sugiriendo zonas (en un espacio bidimensional donde hay un gradiente de concentración de los compuestos) donde es más probable encontrar un estado de actividad mayor o menor respecto al control. El diseño experimental tomó en consideración solo efectos marginales (que son las combinaciones binarias 1:1) versus tratamientos aislados, por lo que los gradientes de combinaciones binarias no-balanceadas (por ejemplo, 0.04:0.16, 0.04.0:64) quedaron relegadas. Sin embargo, se generó un modelo no-lineal de distribución binomial negativa para predecir los efectos de esas combinaciones no evaluadas, con tal de robustecer análisis posteriores.

De esta forma, se construyeron modelos no lineales de distribución binomial negativa para cada subgrupo de datos, asumiendo interacción entre los compuestos (factores con niveles).

```
#generación de modelo GLM Binomial Negativa
glm.nb1 <-lapply(list.norm[1:10], function(a) {
  z <- glm.nb(act ~ conc1 * conc2, data = a)
  return(z)
})

#extracción de coeficientes
coef.glm.nb1 <- lapply(glm.nb1[1:10], coef)
#comprobando
str(coef.glm.nb1)
#consolidando resultados
do.call(rbind, coef.glm.nb1)
```

La consola muestra que espacios vacíos de los coeficientes, indicando la falta de las combinaciones desbalanceadas. Luego se genera entonces un resumen de resultados, un modelo ajustado y su posterior evaluación con `anova()`.

```
#resúmenes de resultados
glm.nb1.summary <-lapply(list.norm[1:10], function(a) {
  zz <- summary(glm.nb(act ~ conc1 * conc2, data = a))
  return(zz)
})

#generando un modelo ajustado
glm.nb1.aov <-lapply(list.norm[1:10], function(a) {
  zz <- aov(glm.nb(act ~ conc1 * conc2, data = a))
  return(zz)
})

#evaluando el modelo
glm.nb1.anova <-lapply(list.norm[1:10], function(a) {
  zz <- anova(aov(glm.nb(act ~ conc1 * conc2, data = a)))
})

#resultados
glm.nb1.anova
```

El modelo generado sugiere que existen efectos significativos entre cada factor y en sus diferentes niveles. Luego, se generó un modelo de predicción de actividad para las combinaciones desbalanceadas.

Primero se cargó una plantilla que contiene celdas vacías para evaluar la actividad teórica de las combinaciones desbalanceadas modeladas.

```
#cargando plantillas para predicción
plt <- read.csv(file=~ /scripts/simula_data.csv", sep=";", header=TRUE)
plt.s<-plt
#submuestreo en la lista
datalist2<-split(plt, plt$plate)
#concentración y compuestos como factores
datalist2<-map(datalist2, ~mutate_at(.x, factor_cols, factor))
#generando tibble
datalist2<-map(datalist2, as_tibble)
```

Luego se generó un ciclo de iteración antes de la asignación de las predicciones:

```
cohesion.r <- list()
resul.sim2 <- list()
# ciclo de predicción
for (i in 1:10) {
  resul.sim2[[i]]<-ldply(glm.nbl, predict, type="response",
datalist2[[i]]
[,5:6])
  cohesion.r[[i]]<-resul.sim2[[i]][i,2:37]
  colnames(cohesion.r[[i]])<-as.numeric(colnames(cohesion.r[[i]]))
}
#verificando concentración / extracción para evitar redundancia
concl<-
as.data.frame(datalist2[[1]][c(1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34),5])
conc2<-
as.data.frame(datalist2[[1]][c(1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34),6])
concl$concl
conc2$conc2
# creando 12 combinaciones de etiquetas para columnas de concentracion
col_n <- matrix()
for (i in seq(1,12, by=1)) {
  col_n[i] <- paste(as.character(concl$concl[i]), "~",
as.character(conc2$conc2[i]))
}
col_n
#extracción de columnas para evitar redundancia
extractColumns = function(x){
  x[,c(1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34)]
}
```

En las dos columnas anteriores se generaron etiquetas identificadoras para las columnas de cada submuestra, luego se realizó la extracción de columnas para evitar redundancia.

Luego, se procede a generar la predicción:

```
#generando objeto para predicción
prediccion_1 = lapply(cohesion.r,extractColumns) %>% bind_rows()
colnames(prediccion_1)<-col_n
prediccion_1
#generando etiquetas para filas
comp1_name <-matrix()
comp2_name <-matrix()
for (i in seq(1,10, by=1)) {
  comp1_name[i]<-as.data.frame(datalist2[[i]][i,3])
  comp2_name[i]<-as.data.frame(datalist2[[i]][i,4])
}
comp1_name<-as.data.frame(as.matrix(comp1_name))
comp2_name<-as.data.frame(as.matrix(comp2_name))

row_1 <-c()
for (i in seq(1,10, by=1)) {
  row_1[i] <-as.character(paste(comp1_name[i,],"~",comp2_name[i,]))
}
row.names(prediccion_1)<-row_1
prediccion_1
```

Así, se generaron las columnas de predicción para combinaciones desbalanceadas. Con estos datos se puede generar una nueva plantilla que unirá las combinaciones binarias balanceadas y aquellas desbalanceadas junto al control y los tratamientos sin combinación.

```
#verificando integridad
rownames(prediccion_1)
colnames(prediccion_1)
#transformando formato de prediccion_1 a tidyverse
tidy.pred <-prediccion_1 %>%
  #si es matrix convertir en data.frame
  #as.data.frame() %>%
  rownames_to_column() %>%
  pivot_longer(cols = -rowname) %>%
  unite(name, rowname, name, sep = "/")
pred1 <-as.data.frame(as.data.frame(tidy.pred))
predd1<-as.data.frame(pred1[2])
vect1<-matrix(data=NA, nrow=10*12, ncol=3, byrow=T, dimnames=NULL)

for (i in 1:120) {
  vect1[i,1:3] <- abs(rnorm(n=3, mean=sapply(predd1[i,1],mean), sd=0.1))
}
```

Luego se unificaron los datos de las combinaciones balanceadas experimentales y las combinaciones desbalanceadas modeladas.

```
vect1<-as.data.frame(vect1)
rownames(vect1)<-as.matrix(pred1[1])
#resultados de simulaciones
vect1p<-array(unmatrix(vect1[1:120,1:3], byrow=T))
datalist3<-plt
datalist3$act<-vect1p
#resultados normalizados
nnorm<-array(unlist(obj2_norm))
data2<-data
data2$act<-nnorm
#uniendo datos y generando unión de modelos
model_sim1<-rbind(datalist3,data2)
model_sim1
```

A4.1.7 Carga de Datos

El formato BIGL necesita que los encabezados posean un nombre de columna y un orden específicos, el siguiente código prepara, respalda y genera una tabla con el formato especificado:

```
#cambiando a formato BIGL (ejecutar solo una vez por carga)
model_sim1 <- model_sim1[,c(1,3,4,7,5,6,2,8)]
model_sim1[c(7,8)]<-NULL
colnames(model_sim1)<-c("experiment", "cpd1", "cpd2", "effect", "d1", "d2")
model_sim1$cpd2[model_sim1$cpd2 == c("CAT")] <- c("Catechol") #corrigiendo
etiqueta
str(model_sim1)
write.csv(model_sim1,"~/data/mergemodel.csv", row.names = FALSE)
model_sim1 <- read.csv(file="~/data/mergemodel.csv", sep=",", header=T)
#definiendo listas vacias para almacenamiento
model.subset<-list()
marginalFits<-list()
for (i in 1:10) {
model.subset[[i]]<-model_sim1[ model_sim1$experiment == i,]
rownames(model.subset[[i]])<-NULL
model.subset[[i]]$experiment<as.numeric(as.character(model.subset[[i]]$ex
periment))

model.subset[[i]]$d1<-as.numeric(as.character(model.subset[[i]]$d1))

model.subset[[i]]$d2<-as.numeric(as.character(model.subset[[i]]$d2))

model.subset[[i]]$effect<-
as.numeric(as.character(model.subset[[i]]$effect))

model.subset[[i]]$cpd1<-as.factor(as.character(model.subset[[i]]$cpd1))
model.subset[[i]]$cpd2<-as.factor(as.character(model.subset[[i]]$cpd2))
}
```

La librería `BIGL` posee una serie de funciones que permiten evaluar diferentes modelos y representaciones gráficas de los efectos de combinaciones balanceadas y desbalanceadas. A continuación, se generó el ajuste de marginales. Los modelos marginales son estimados usando un método no-lineal de cuadrados menores que es representado por la función `fitMarginals`. El resultado genera un objeto de clase `MarginalFit` que contiene la información sobre los modelos y coeficientes estimados. En este caso, los 10 diferentes sets de experimentos con combinaciones serán almacenados en el objeto `marginalFits.optim1`.

```
marginalFits.optim1<-list()
#ajuste de marginales
for (i in 1:10) {
  marginalFits.optim1[[i]]<-
fitMarginals(as.data.frame(model.subset[[i]]),
method="optim")
}
```

De esta forma se genera un modelo ajustado para luego ser usado en los modelos de Loewe y HSA.

```
#resumen de ajustes
summary_models.optim1<-list()
for(i in 1:10) {
  summary_models.optim1[[i]]<- summary(marginalFits.optim1[[i]])}
summary_models.optim1
```

Luego se genera la representación gráfica:

```
#etiquetas de gráficos
ecompl<-list()
ecomp2<-list()
ggptitles<-list()
plotlist.optim1<-list()
plotlist.optim2<-list()
```

```
for (i in 1:10) {
  ecomp1[i]<-as.character(marginalFits.optim[[i]]$data$cpd1[1])
  ecomp2[i]<-as.character(marginalFits.optim[[i]]$data$cpd2[1])
  ggptitles[i]<-as.character(paste(ecomp1[i], "~", ecomp2[i]))

  plotlist.optim1[i]<-list(assign(paste0("fitplot", i),
                                plot(marginalFits.optim[[i]]) +
                                ggtitle(ggptitles[i])))
}
```



```
#generando resumen de gráficos 9x3+1
n<-length(plotlist.optim1)
nCol<-floor(sqrt(n))
do.call("grid.arrange", c(plotlist.optim1, ncol=nCol))
#generando pdf con gráficos
#pdf graphs/plotlist.optim.pdf
#  width = 12, height = 7,
#  bg = "white",
#  paper = "A4r")
#do.call("grid.arrange", c(plotlist.optim1, ncol=nCol))
#dev.off()
```

A4.1.8 Evaluación de respuestas esperadas

La librería `BIGL` posee cinco tipos de modelos nulos para calcular superficies de respuesta. Una superficie de respuesta es una representación en tres dimensiones del efecto generado por las distintas combinaciones ensayadas.

Los modelos contenidos en la librería son:

- Modelo generalizado de Loewe.
- Modelo clásico de Loewe.
- Modelo de *Highest Single Agent* (HSA).
- Modelo de Independencia de Bliss.
- Modelo generalizado alternativo de Loewe.

En este caso se emplearon los modelos de Loewe clásico y HSA, donde los procedimientos de ajustes de marginales fueron `null_model = "loewe"`, para el cálculo de respuesta usando Loewe, y `null_model = "hsa"`, para el cálculo de respuesta usando HSA.

A4.1.9 Ajuste de superficie para Modelo de Loewe

Después de la obtención del modelo optimizado, es realizado un ajuste de superficie:

```
# ajuste de superficie: 100 bootstrap
# tiempo de ejecución: ~10 a 15 minutos
# la ejecución puede generar muchos dialogos en la terminal
res.surf.loewe<-list()
for (i in 1:10) {
  res.surf.loewe[[i]]<- fitSurface(
    model.subset[[i]],
    marginalFits.optim1[[i]],
    null_model = "loewe",
    B.CP = 100, statistic = "none",
    parallel = FALSE
  )
}
```

Una vez calculados los ajustes de superficie, se procede a generar isobogramas a partir de la matriz obtenida desde los cálculos de respuesta esperada de los modelos. Sin embargo, la función `isobologram` de la librería `BIGL` debe ser modificada previamente para homologar las escalas. Este paso solo es necesario una vez por sesión.

```
#homologación
#!solo una vez por sesion
trace(isobologram,edit=T)
... //
scale_colour_gradient(limits=c(0,1))
... //
```

Luego, los isobogramas son almacenados en listas y agregados a un panel gráfico.

```
isobolograms.loewe<-list()
for (i in 1:10) {
  #isobolograms H1 optim // names
  res.surf.loewe[[i]]$names <-c(
    as.character(res.surf.loewe[[i]]$data$cpd1[1]),
    as.character(res.surf.loewe[[i]]$data$cpd2[1])
  )
  #isobolograms H1 optim // list of isolograms
  isobolograms.loewe[[i]]<-isobologram(res.surf.loewe[[i]],
  legend = T,
  #definiendo resolución
  grid.len = 200,
  logScale = T)
}

multiplot.obj1<-multiplot(
isobolograms.loewe[[1]], isobolograms.loewe[[2]], isobolograms.loewe[[3]],
isobolograms.loewe[[4]], isobolograms.loewe[[5]], isobolograms.loewe[[6]],
isobolograms.loewe[[7]], isobolograms.loewe[[8]], isobolograms.loewe[[9]],
isobolograms.loewe[[10]],
cols=2, byrow=T
)
#PDF GRAPH
#pdf("graph/multiplot.loewe.pdf"),
# width = 12, height = 7,
# bg = "white",
# paper = "A4r")
#plot(multiplot(isobolograms.loewe[[1]], isobolograms.loewe[[2]],
isobolograms.loewe[[3]],
# isobolograms.loewe[[4]], isobolograms.loewe[[5]],
isobolograms.loewe[[6]],
# isobolograms.loewe[[7]], isobolograms.loewe[[8]],
isobolograms.loewe[[9]],
# isobolograms.loewe[[10]], cols=4, byrow = T))
#dev.off()
```

A4.1.10 Ajuste de superficie para modelo HSA

El otro ajuste de superficie realizado fue para el análisis HSA. El procedimiento es similar al descrito para el modelo de aditividad de Loewe: se realiza el ajuste de superficie tomando el nivel de ajuste de los marginales, junto al modelo nulo generado por HSA con 100 *bootstrap*. Luego, el resultado es usado para generar isobologramas, agrupamiento y presentación en panel gráfico.

```
#ajustes de superficie HSA
res.surf.hsa1<-list()
for (i in 1:10) {
  #HSA H1 Optim
  res.surf.hsa1[[i]]<- fitSurface(
    model.subset[[i]],
    marginalFits.optim[[i]],
    null_model = "hsa",
    B.CP = 100, statistic = "none",
    parallel = FALSE)
}
#isobologramas HSA
isobolograms.hsa1<-list()
for (i in 1:10) {
  res.surf.hsa1[[i]]$names <- c(
    as.character(res.surf.hsa1[[i]]$data$cpd1[1])
    as.character(res.surf.hsa1[[i]]$data$cpd2[1])
  )
  isobolograms.hsa1[[i]]<-isobologram(
    res.surf.hsa1[[i]],
    legend = T, grid.len = 200,
    logScale = T)
}
#generando resumen de gráficos 9 x 3 + 1 multiplot HSA y HSA.1
multiplot.h.obj1<-multiplot(
  isobolograms.hsa1[[1]], isobolograms.hsa1[[2]], isobolograms[[3]],
  isobolograms.hsa1[[4]], isobolograms.hsa1[[5]], isobolograms[[6]],
  isobolograms.hsa1[[7]], isobolograms.hsa1[[8]], isobolograms[[9]],
  isobolograms.hsa1[[10]], cols=2, byrow=T
)
#PDF GRAPH
#pdf("graphs/multiplot.hsa.pdf",
#   width = 12, height = 7,
#   bg = "white",
#   paper = "A4r")
#plot(multiplot(isobolograms.hsa1[[1]], isobolograms.hsa1[[2]],
#   isobolograms.hsa1[[3]], isobolograms.hsa1[[4]],
#   isobolograms.hsa1[[5]], isobolograms.hsa1[[6]],
#   isobolograms.hsa1[[7]], isobolograms.hsa1[[8]],
#   isobolograms.hsa1[[9]], isobolograms.hsa1[[10]],
#   cols=4, byrow = T))
#dev.off()
```

A4.1.11 Cálculo de Errores Normales y No-normales – modelo de Loewe y HSA

Una vez obtenidos los isobogramas, pueden establecerse zonas de probabilidad (dentro del espacio de combinaciones) de encontrar que los efectos generados están desviados negativa o positivamente respecto al control. La paleta de colores de la representación gráfica indica un cambio en la respuesta, que va desde 0 a 1 (donde 1 es igual al nivel de actividad del control). Sin embargo, para establecer diferencias entre combinaciones o encontrar puntos de sinergismo o antagonismo, deben ser evaluados los errores normales y no-normales, tanto para el modelo de aditividad de Loewe como para el modelo HSA.

```
#CALCULO ERRORES NORMALES y NO NORMALES - LOEWE / HSA
#elección h1 : optim1 LOEWE / HSA
# PARA modelar el cálculo de errores para hsa,
# solo debe reemplazarse .loe por .hsa
# en el siguiente código
meanRN.loe<-list()
meanRNO.loe<-list()
maxRN.loe<-list()
maxRNO.loe<-list()
maxRN.b.loe<-list()
maxRNO.b.loe<-list()
#calculo demora ~25 minutos
for (i in 1:10) {
#---- H1 OPTIM LOEWE /HSA MODEL##
# MEAN R - NORMAL ERRORS
meanRN.loe[[i]] <- fitSurface(model.subset[[i]],
                             marginalFits.optim1[[i]],
                             statistic = "meanR",
                             CP = res.surf.loewe[[i]]$CP, #res.surf.hsa1
                             B.B = NULL,
                             parallel = FALSE)

# MEAN R - NOT-NORMAL ERRORS
meanRNO.loe[[i]] <- fitSurface(model.subset[[i]],
                               marginalFits.optim1[[i]],
                               statistic = "meanR",
                               CP = res.surf.loewe[[i]]$CP, #res.surf.hsa1
                               B.B = 20,
                               parallel = FALSE)

# MAX R - NORMAL ERRORS
maxRN.loe[[i]] <- fitSurface(model.subset[[i]],
                             marginalFits.optim1[[i]],
                             statistic = "maxR",
                             CP = res.surf.loewe[[i]]$CP, #res.surf.hsa1
                             B.B = NULL,
                             parallel = FALSE)

# MAX R - NOT-NORMAL ERRORS
maxRNO.loe[[i]] <- fitSurface(model.subset[[i]],
                              marginalFits.optim1[[i]],
                              statistic = "maxR",
                              CP = res.surf.loewe[[i]]$CP, #res.surf.hsa1
                              B.B = 20,
```

```

parallel = FALSE)
# BOTH R - NORMAL ERRORS
maxRN.b.loe[[i]] <- fitSurface(model.subset[[i]],
                              marginalFits.optim1[[i]],
                              statistic = "both",
                              CP = res.surf.loewe[[i]]$CP, #res.surf.hsa1
                              B.B = NULL,
                              parallel = FALSE)
# BOTH R - NOT-NORMAL ERRORS
maxRNO.b.loe[[i]] <- fitSurface(model.subset[[i]],
                              marginalFits.optim1[[i]],
                              statistic = "both",
                              CP = res.surf.loewe[[i]]$CP, #res.surf.hsa1
                              B.B = 20,
                              parallel = FALSE)
}

```

A4.1.12 Análisis de Sinergismo

Una vez calculados los distintos tipos de errores para ambos modelos, se procede a realizar el análisis de sinergismo.

```

# ANALISIS DE SINERGISMO
#LOE y HSA maxR both
maxR.both.loe.tot<-list()
maxR.both.hsa.tot<-list()

for (i in 1:10){
  maxR.both.loe.tot[[i]] <- rbind(summary(maxRN.loe[[i]]$maxR)$totals,
                                summary(maxRNO.loe[[i]]$maxR)$totals)
  maxR.both.hsa.tot[[i]] <- rbind(summary(maxRN.hsa[[i]]$maxR)$totals,
                                summary(maxRNO.hsa[[i]]$maxR)$totals)
  rownames(maxR.both.loe.tot[[i]]) <- c("Normal errors", "Bootstrapped
errors")
  rownames(maxR.both.hsa.tot[[i]]) <- c("Normal errors", "Bootstrapped
errors")
}
#resultados de analisis de sinergismo
kable(maxR.both.loe.tot)
kable(maxR.both.hsa.tot)

#MeanR both
MeanR.both.loe<-list()
results.MR.b.loe<-list()
MeanR.both.hsa<-list()
results.MR.b.hsa<-list()
for (i in 1:10){
MeanR.both.loe[[i]] <- rbind(
  "Normal errors" = c(
    as.numeric(meanRN.loe[[i]]$meanR$FStat),
    (as.numeric(meanRN.loe[[i]]$meanR$P.value))),
  "Bootstrapped errors" = c(
    as.numeric(meanRNO.loe[[i]]$meanR$FStat),
    (as.numeric(meanRNO.loe[[i]]$meanR$P.value))))
}

```

```

MeanR.both.hsa[[i]] <- rbind(
  "Normal errors" = c(
    as.numeric(meanRN.hsa[[i]]$meanR$FStat),
    (as.numeric(meanRN.hsa[[i]]$meanR$p.value))),
  "Bootstrapped errors" = c(
    as.numeric(meanRNO.hsa[[i]]$meanR$FStat),
    (as.numeric(meanRNO.hsa[[i]]$meanR$p.value)))
  colnames(MeanR.both.loe[[i]])<-c("F-statistic", "p-value")
  colnames(MeanR.both.hsa[[i]])<-c("F-statistic", "p-value")
  results.MR.b.loe[[i]]<-kable(MeanR.both.loe[[i]])
  results.MR.b.hsa[[i]]<-kable(MeanR.both.hsa[[i]])
}
results.MR.b.loe
results.MR.b.hsa
# cálculo puntos externos
out.pts.maxRN.loe<-list()
out.pts.maxRNO.loe<-list()
out.pts.maxRN.b.loe<-list()
out.pts.maxRNO.b.loe<-list()
for (i in 1:10){
  out.pts.maxRN.loe[[i]]<-outsidePoints(maxRN.loe[[i]]$maxR$Ymean)
  out.pts.maxRNO.loe[[i]]<-outsidePoints(maxRNO.loe[[i]]$maxR$Ymean)
  out.pts.maxRN.b.loe[[i]]<-outsidePoints(maxRN.b.loe[[i]]$maxR$Ymean)
  out.pts.maxRNO.b.loe[[i]]<-outsidePoints(maxRNO.b.loe[[i]]$maxR$Ymean)
}

#cambiando nombres
for (i in 1:10){
  maxRNO.loe[[i]]$names<-c(
    as.character(res.surf.loewe[[i]]$data$cpd1[1]),
    as.character(res.surf.loewe[[i]]$data$cpd2[1]))
  maxRNO.hsa[[i]]$names<-c(
    as.character(res.surf.hsa1[[i]]$data$cpd1[1]),
    as.character(res.surf.hsa1[[i]]$data$cpd2[1]))
}
### resumen de maxR Errores No Normales para LOE y HSA
summarymaxRNO.loe<-list()
summarymaxRNO.hsa<-list()
for (i in 1:10){
summarymaxRNO.loe[[i]]<-summary(maxRNO.loe[[i]]$confInt)
summarymaxRNO.hsa[[i]]<-summary(maxRNO.hsa[[i]]$confInt)
}

#ciclo for para plotConfInt para cada maxR- Error No-normal calculado
plot.conf.int.loe<-list()
plot.conf.int.hsa<-list()
for (i in 1:10){
  plot.conf.int.loe[[i]] <- plotConfInt(maxRNO.loe[[i]], color = "effect-
size")
  plot.conf.int.hsa[[i]] <- plotConfInt(maxRNO.hsa[[i]], color = "effect-
size")
}

```

```

plot.conf.int.loe[[i]]$labels$y<-
c(as.character(res.surf.loewe[[i]]$data$cpd2[1]))

plot.conf.int.hsa[[i]]$labels$x<c(as.character(res.surf.hsa1[[i]]$data$cp
d1[1]))

plot.conf.int.hsa[[i]]$labels$y<-
c(as.character(res.surf.hsa1[[i]]$data$cpd2[1]))
}

```

Finalmente, son obtenidas las tablas de aditividad para los modelos de Loewe y HSA, para su representación gráfica en paneles.

```

#esquemas - Aditividad de Loewe / HSA
# reemplazar .loe por .hsa
plot(
  multiplot(
    plot.conf.int.loe[[1]], plot.conf.int.loe[[2]],
    plot.conf.int.loe[[3]], plot.conf.int.loe[[4]],
    plot.conf.int.loe[[5]], plot.conf.int.loe[[6]],
    cols = 1, byRow = T
  )
)
plot(
  multiplot(
    plot.conf.int.loe[[7]], plot.conf.int.loe[[8]],
    plot.conf.int.loe[[9]], plot.conf.int.loe[[10]],
    cols = 1, byRow = T
  )
)
#PDF GRAPH
#pdf("graphs/multiplot.conf.int.loe.pdf", #/"~.hsa.pdf"
#   width = 10, height = 12,
#   bg = "white",
#   paper = "A4")

#dev.off()

```

A4.2 ANÁLISIS DE CLÚSTER PARA MALDI TOF/TOF MS

A4.2.1 Lectura de Datos

Primero es leído el archivo `.csv` que contiene los datos:

```
#cargando librerias
library(knitr)
library(vegan)
library(stargazer)
#importación archivo csv
dataMALDI <-
read.csv("/Users/Robert/Desktop/MGR_2/MGR/MALDI/DATOS_MALDI_CLEAN_2.csv",
         header = T, sep=";", dec=",")
#conservando etiquetas
d.M.labels = dataMALDI$treatment
#homologando formatos de puntos, coma y números.
for (i in 2:4){
dataMALDI[[i]] <-
as.numeric(as.character(gsub(",", "", dataMALDI[[i]], fixed=T)))
}
dataMALDI[[5]] <- as.numeric(dataMALDI[[5]], fixed=T)
dataMALDI[[1]] <- as.numeric(as.factor(dataMALDI[[1]]))
```

Verificando el objeto:

```
str(dataMALDI)

'data.frame':   137 obs. of  5 variables:
 $ treatment: num  3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 ...
 $ m_z      : num  3.48 5.5 5.51 5.52 5.54 ...
 $ intens   : num  2.06 1.05 1.39 1.98 2.5 ...
 $ qf       : num  3578 1403 1609 1545 662 ...
 $ sn_r..   : num  6 7 9 12 17 19 20 19 17 13 ...
```

El archivo contiene 5 columnas: `treatment` que designa al tipo de tratamiento, `m_z` que representa a masa/carga, `intens` que representa la intensidad de señal para cada masa carga, `qf` (factor de calidad) y `sn_r` tasa de señal/ruido. Estos dos últimos parámetros son informativos sobre la calidad de señales. Mientras que masa/carga informa sobre el peso molecular de los analitos, la intensidad informa sobre la abundancia relativa de estos en las muestras.

A4.2.2 Test de Normalidad

Se realizó el test de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar si hay una distribución normal para los parámetros cuantificados.

```
#test de normalidad para distribuciones en columnas
kolm.smir.test.m_z <-list()
kolm.smir.test.intens <-list()
kolm.smir.test.qf <-list()
#test de normalidad para distribucion de masa/carga
kolm.smir.test.m_z <- ks.test(dataMALDI$m_z,
                             pnorm, mean(dataMALDI$m_z),
                             sd(dataMALDI$m_z))
#test de normalidad para distribucion de intensidad
kolm.smir.test.intens <- ks.test(dataMALDI$intens,
                                 pnorm, mean(dataMALDI$intens),
                                 sd(dataMALDI$intens))
#test de normalidad para distribucion de factor de calidad
kolm.smir.test.qf <- ks.test(dataMALDI$qf,
                              pnorm, mean(dataMALDI$qf),
                              sd(dataMALDI$qf))
```

A4.2.3 Análisis de clúster

Primero se procede a escalar y centrar una matriz de datos con la función `scale`, luego se invocó a la función `daisy` (*Dissimilarity Matrix Calculation*) desde la librería `cluster` para computar pares de diferencias (distancias) entre observaciones en el set de datos. En este caso se utilizó el coeficiente de disimilitud de Gower como métrica (Gower, 1971).

Luego, se hizo una representación gráfica de la matriz de distancias, sin etiquetas, con la función `hclust` de la librería `stats` (`method = "complete"`), con tal de verificar si el algoritmo generó un agrupamiento de objetos basándose en sus distancias.

A4.2.4 Análisis de PERMANOVA

Posteriormente se procede al análisis de PERMANOVA.

```
#escalando y generando cluster
dataMALDI.scaled <- scale(dataMALDI, scale=T)
library(cluster)
#generando matriz (data.frame) de distancias de disimilitud
distance.dm.MALDI <-daisy(dataMALDI.scaled, metric="gower")
#observando
summary(distance.dm.MALDI)
#matriz de distancias en dendrograma / sin etiquetas
plot(hclust(distance.dm.MALDI))
dist.hclust.dm.MALDI <- hclust(distance.dm.MALDI)
```

```
#incluyendo etiquetas
dist.hclust.dm.MALDI$labels <- d.M.labels
```

Existen dos objetos con los que se trabaja: `dataMALDI` (donde están los datos) y `distance.dm.MALDI` (que es la matriz de disimilitud/distancias generadas).

Primero se utiliza la función `adonis2` de la librería `vegan` para realizar análisis multivariado permutacional de varianzas no-paramétrico utilizando matrices de distancia. En los parámetros de la función se puede determinar el número de permutaciones necesarias (en este caso 999), se utilizaron dos métodos, `binomial` y `euclidean` que son métodos para calcular distancias de pares. En este caso es designada la columna `intens` como la variable dependiente.

```
#test de permutación usando adonis
#para método binomial todas las columnas
dataMALDI.bin.ado.test<-adonis2(dataMALDI$intens~treatment+m_z+qf,
data=dataMALDI,
                                permutations = 999, method="binomial")
#para método euclidean todas las columnas
dataMALDI.euc.ado.test<-adonis2(dataMALDI$intens~treatment+m_z+qf,
data=dataMALDI,
                                permutations = 999, method="euclidean")
#existen diferencias significativas entre tratamientos?

stargazer(t(t(as.data.frame(dataMALDI.bin.ado.test))), type = "text")

=====
              Df  SumOfSqs   R2      F    Pr(> F)
-----
treatment    1    0.259   0.033  5.025   0.025
m_z          1    0.621   0.080 12.062   0.001
qf           1    0.002  0.0003  0.044   0.905
Residual   133    6.852   0.886
Total      136    7.734    1
=====
```

A partir del resultado anterior, el análisis sugiere que se detectan diferencias significativas entre los tratamientos. Por otra parte, los análisis sugieren que masa/carga (`m_z`) estaría explicando la variabilidad de las intensidades de señales observadas. Es sabido que la tasa de ruido/señal está directamente relacionada con masa/carga, por lo que, para evitar sobreexplicación, el modelo a explorar solo considera tratamientos y masa/carga.

Luego la función `vegdist` de la librería `vegan` puede calcular las distancias (del mismo modo que `adonis2` y `daisy` junto a `hclust`) y el objeto que resulta de la transformación (matriz de disimilitudes) puede ser utilizada para probar si existe Homogeneidad Multivariada de Dispersiones (varianzas) de grupos. Esta prueba generará distancias no-euclidianas entre objetos y grupos de centroides

```

#cargando librería para análisis PERMANOVA
library(vegan)
#estableciendo como factor a los tratamientos
dataMALDI$treatment<-as.numeric(as.factor(dataMALDI$treatment))
#se pueden usar otros tipos de matrices de distancia,
#intentando generar por vegan: Binomial y Euclideo
#modelo binomial incluyendo todas las columnas
dataMALDI.bin.dist<-vegdist(dataMALDI,
                             method='binomial')
#modelo binomial incluyendo intensidad y m/z
dataMALDI.imz.bin.dist<-vegdist(dataMALDI$intens,
                                 method='binomial')
#modelo euclideo incluyendo todas las columnas
dataMALDI.euc.dist<-vegdist(dataMALDI,
                              method='euclidean')
#modelo euclideo incluyendo intensidad y m/z
dataMALDI.imz.euc.dist<-vegdist(dataMALDI$intens+dataMALDI$m_z,
                                 method='euclidean')

#cuantos niveles de tratamiento existen?
levels(as.factor(d.M.labels))

```

Así la consola arroja los niveles de los factores:

```
'CAR' 'CAR+NPCu' 'CONTROL' 'IPR' 'IPR+NPCu' 'NPCu' 'NPCuO'
```

Luego cada columna es representada como un factor o tratamiento, proponiendo la hipótesis que, al ser factores, afectan a la variabilidad de masa/carga.

```

#tratando como factor a columna tratamientos
dataMALDI$treatment<-factor(dataMALDI$treatment,
                             labels=c(levels(as.factor(d.M.labels))))
# modelando todas las variables para método binomial
disp.bin<-betadisper(dataMALDI.bin.dist,
                     group=dataMALDI$treatment,
                     type="centroid",bias.adjust=FALSE,
                     sqrt.dist=FALSE,add=FALSE)
#modelado para intensidad y masa/carga
disp.i.bin<-betadisper(dataMALDI.imz.bin.dist,
                       group=dataMALDI$treatment,
                       type="centroid",bias.adjust=FALSE,
                       sqrt.dist=FALSE,add=FALSE)
# modelando todas las variables para método euclideo
disp.euc<-betadisper(dataMALDI.euc.dist,
                     group=dataMALDI$treatment,
                     type="centroid",bias.adjust=FALSE,
                     sqrt.dist=FALSE,add=FALSE)
disp.i.euc<-betadisper(dataMALDI.imz.euc.dist,
                       group=dataMALDI$treatment,
                       type="centroid",bias.adjust=FALSE,
                       sqrt.dist=FALSE,add=FALSE)

```

```
# los resultados indican que hay diferencias entre
# dispersiones de grupos

#etiqueta de filas como factores
rownames (disp.bin$centroids)<-levels (as.factor (d.M.labels))
levels (disp.bin$group)<-levels (as.factor (d.M.labels))
rownames (disp.euc$centroids)<-levels (as.factor (d.M.labels))
levels (disp.euc$group)<-levels (as.factor (d.M.labels))
rownames (disp.i.bin$centroids)<-levels (as.factor (d.M.labels))
levels (disp.i.bin$group)<-levels (as.factor (d.M.labels))
rownames (disp.i.euc$centroids)<-levels (as.factor (d.M.labels))
levels (disp.i.euc$group)<-levels (as.factor (d.M.labels))
```

Una vez calculada la dispersión (distancias no-euclidianas entre grupos y sus respectivos centroides), se puede probar si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos.

```
#ANOVA: resultados para dispersiones incluyendo todas las variables, método
binomial
stargazer (t (t (as.data.frame (anova (disp.bin)))), type = "text")
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(> F)
Groups	6	1.035	0.173	2.752	0.015
Residuals	130	8.148	0.063		

En este caso, el valor de p es menor a 0.05, por lo tanto, existirían diferencias significativas entre los grupos.

Luego se realiza un test de permutación para probar homogeneidad multivariada de varianzas entre grupos. En este caso interesa conocer qué diferencias hay entre los diferentes grupos, generándose un análisis de comparación por pares (*pairwise*).

```
#permutest para modelo de dispersion: metodo binomial
permutest.i.bin<-permutest(disp.i.bin, pairwise=TRUE, permutations=999)
permutest.i.bin$groups<-c(levels(as.factor(d.M.labels)))
pairwise.bin <- matrix(0, ncol = 7, nrow = 7)
pairwise.bin[lower.tri(pairwise.bin)] <- permutest.i.bin$pairwise$observed
pairwise.bin[upper.tri(pairwise.bin)] <- permutest.i.bin$pairwise$permuted
colnames(pairwise.bin)<-permutest.i.bin$groups
rownames(pairwise.bin)<-permutest.i.bin$groups
pairwise.bin<-as.data.frame(pairwise.bin)

stargazer(t(t(as.data.frame(permutest.i.bin$tab))), type = "text")

=====
              Df  Sum Sq Mean Sq    F  N.Perm Pr(> F)
-----
Groups         6  0.899   0.150  7.747  999   0.001
Residuals    130  2.514   0.019
-----
```

Resultado del análisis de comparación por pares:

```
stargazer(t(t(as.data.frame(pairwise.bin))), type = "text")
```

	CAR	CAR+CuNPs	CONTROL	CuNPs	CuONPs	IPR	IPR+CuNPs
CAR	0	0.615	0.023	0.166	0.152	0.726	0.397
CAR+CuNPs	0.617	0	0.529	0.605	0.970	0.104	0.971
CONTROL	0.030	0.168	0	0.940	0.397	0.599	0.653
CuNPs	0.538	0.973	0.105	0	0.961	0.173	0.467
CuONPs	0.172	0.399	0.589	0.392	0	0.085	0.275
IPR	0.568	0.953	0.166	0.974	0.469	0	0.690
IPR+CuNPs	0.943	0.695	0.084	0.656	0.255	0.676	0

Así, el análisis sugiere que solo existen diferencias entre Carbendazim (CAR) y Control: en el triángulo bajo la diagonal están los valores observados y en el triángulo superior a la diagonal están los valores permutados. Existen algunas diferencias entre estos. El método utilizado es binomial.

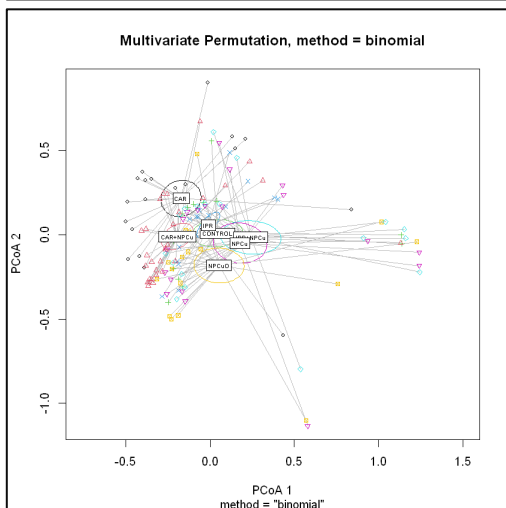
Posteriormente, se realiza un test de Tukey (función `TukeyHSD`) para observar diferencias entre tratamientos.

```
#Test de Tukey post-hoc para encontrar diferencias entre tratamientos
(metodo binomial)
stargazer(t(t(as.data.frame(head(displ.i.bin.HSD
TukeyHSD(displ.i.bin))))), type="text")
#como se puede observar, existen diferencias entre dd

=====
              group.diff group.lwr group.upr group.p.adj
-----
CAR+NPCu-CAR      -0.066   -0.187    0.054    0.651
CONTROL-CAR       0.026   -0.121    0.173    0.998
IPR-CAR          -0.090   -0.234    0.054    0.504
IPR+NPCu-CAR     0.148    0.012    0.283    0.023
NPCu-CAR         0.086   -0.049    0.221    0.485
NPCuO-CAR        0.085   -0.050    0.220    0.494
CONTROL-CAR+NPCu 0.093   -0.041    0.226    0.372
IPR-CAR+NPCu    -0.023   -0.154    0.107    0.998
IPR+NPCu-CAR+NPCu 0.214    0.093    0.335    0.00001
NPCu-CAR+NPCu   0.152    0.031    0.273    0.004
NPCuO-CAR+NPCu  0.151    0.031    0.272    0.005
IPR-CONTROL     -0.116   -0.271    0.039    0.280
IPR+NPCu-CONTROL 0.121   -0.025    0.268    0.176
NPCu-CONTROL     0.059   -0.087    0.206    0.888
NPCuO-CONTROL   0.059   -0.088    0.206    0.892
IPR+NPCu-IPR    0.237    0.093    0.381    0.00005
NPCu-IPR        0.175    0.032    0.319    0.007
NPCuO-IPR       0.175    0.031    0.319    0.007
NPCu-IPR+NPCu   -0.062   -0.197    0.073    0.815
NPCuO-IPR+NPCu  -0.063   -0.198    0.073    0.809
NPCuO-NPCu      -0.001   -0.136    0.135     1
-----
```

Finalmente se generó una representación gráfica de la distribución de las dispersiones multivariadas, y sus distancias a los centroides:

```
plot(displ.bin, axes = c(1,2), ellipse=TRUE, hull=FALSE,
      conf=0.05, main = "Multivariate Permutation, method = binomial",
      label=TRUE, label.cex=0.5)
```



A4.3 BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DETECTADAS EN EL ANÁLISIS DE MALDI TOF/TOF MS.

Aquí se describen los procesos de búsqueda y consulta realizados para encontrar probables proteínas candidatas en el análisis de MALDI TOF/TOF MS.

Se cargan las librerías correspondientes: la librería `OrgMassSpecR` fue utilizada para el cálculo de masas moleculares y monoisotópica de las cadenas polipeptídicas, la librería `Peptides` fue utilizada para calcular el punto isoeléctrico. Las demás librerías son utilizadas para ajustes de tablas, filtrado y submuestreo.

```
#cargando librerias
requiredpackages<-c("knitr","vegan","DescTools","dplyr","tidyverse",
                    "OrgMassSpecR","Peptides","gdata","stargazer")
lapply(requiredpackages, require, character.only = TRUE)
#set working directory - importación archivo csv
setwd("C:/Users/Robert/Desktop/MGR_2/MGR")
dataMALD <- read.csv("MALDI/DATOS_MALDI_CLEAN_2.csv",
                    header = T, sep=";", dec=",")
dataMALDI<-dataMALD
#conservando etiquetas
d.M.labels = dataMALDI$treatment
#homologrando formatos de puntos, coma y números.
dataMALDI[[2]] <- as.numeric(as.character(gsub(",", "", dataMALDI[[2]], fixed=TRUE)))
dataMALDI[[3]] <- as.numeric(as.character(gsub(".", "", dataMALDI[[3]], fixed=TRUE)))
dataMALDI[[4]] <- as.numeric(as.character(gsub(",", "", dataMALDI[[4]], fixed=TRUE)))
dataMALDI[[5]] <- as.numeric(dataMALDI[[5]], fixed=T)
#dataMALDI[[1]] <- as.numeric(as.factor(dataMALDI[[1]]))
dataMALDI[[2]]<-dataMALDI[[2]]*1000

#lectura de datos desde archivos .csv, seleccionando solo
#tratamientos - masa carga (m_z) e intensidad (intens)
dataMALDI2<-dataMALDI[1:3]
# subsetting para cada ensayo de combinacion binaria
dataMALDI2<-split(dataMALDI2, dataMALDI2$treatment)
```

Se carga solo masa/carga (m/z) desde las lecturas, y luego se realiza un agrupamiento (*subsetting*) por tratamiento. Con esto se puede identificar la lista de m/z de cada tratamiento.

A4.3.1 Adquisición desde base de datos

Desde UNIPROT (<https://www.uniprot.org>) fue descargado un archivo .csv que contiene a aquellas proteínas con un peso molecular entre 1000 y 10000 Da para la especie *Nitrobacter winogradskyi*. A partir de la cadena de polipéptidos presentada en cada listado, se realizó la estimación de la masa molecular, masa molecular monoisotópica, y el punto isoeléctrico teórico.

```
#Leyendo archivo en tabulación de primeras proteínas de peso entre 1000 a
10000 Da para Nitrobacter
Nitrobacter.w.list <-
read.csv("UNIPROT/Nitrobacter_winogradskyi_Uniprot.csv",
#Nitrobacter_winogradskyi_Uniprot.csv
          header = TRUE, sep="\t", dec=".")
#url("https://www.uniprot.org/uniprot/?format=tab&query=mass%3A[1000+TO+1
0000]+AND+Nitrobacter&sort=mass//
#//&columns=id,entry,entry+name,organism,protein+names,mass,length,sequen
ce")
#extracción de comas
for (i in 1:713){
Nitrobacter.w.list$Mass[i]<-gsub(",","",Nitrobacter.w.list$Mass[i])
}

#recalculando pesos moleculares, punto isoelectrico y peso monoisotopico
de cada cadena de aa
Monoisotopic.w<-list()
Isoelectric.Point.w<-list()

#Nitrobacter.list
for (i in 1:length(Nitrobacter.w.list$Sequence)){
  Nitrobacter.w.list$Mass[[i]]<-
MolecularWeight(ConvertPeptide(as.character(Nitrobacter.w.list$Sequence[[
i]]),
output = "elements", IAA = FALSE))

  #calculando Pesos Moleculares Monoisotopicos
  Monoisotopic.w[[i]]<-
MonoisotopicMass(ConvertPeptide(as.character(Nitrobacter.w.list$Sequence[[
i]]),
output = "elements", IAA = FALSE))
  #calculando punto isoeléctrico
  Isoelectric.Point.w[[i]]<-
pI(as.character(as.character(Nitrobacter.w.list$Sequence[[i]])),
          pKscale = "EMBOSS")
}
#cohesionando data.frame para submuestreo posterior Nitrobacter.list
Nitrobacter.w.list<-cbind(Nitrobacter.w.list,
as.data.frame(as.numeric(Monoisotopic.w)),
as.data.frame(as.numeric(Isoelectric.Point.w)))
```


A4.3.2 Extracción de proteínas candidatas

Se genera una lista con 7 vectores para representar los 7 tratamientos, cada uno contiene a las m/z detectadas. Mediante el siguiente ciclo de iteración, se seleccionaron (dentro del listado `Nitrobacter.w.list`) a las proteínas de mayor similitud en masa molecular estimada. Los archivos generados son almacenados como `result_w#.csv`, siendo `#` el número de tratamiento (1 a 7).

```
# subsetting para extracción de actividad #ejecutar una vez, append está activado
#lista de 7 vectores
#Nitrobacter.w.list$Mass <- as.character(Nitrobacter.w.list$Mass)
#
mz_obj2<-lapply(dataMALDI2,['[', "m_z")
#subseteando
for(j in 1:7){
  assign(paste0("mzlist2.",j), mz_obj2[[j]])
  for (i in 1:length(as.numeric(eval(parse(text = paste0("mzlist2.",j)))))){
    gdata::write.fwf(as.data.frame(dplyr::filter(Nitrobacter.w.list,
      Mass
      Closest(as.numeric(Nitrobacter.w.list$Mass),
as.numeric(eval(parse(text=paste0("mzlist2.",j)))[i]))) [1,],
      file = paste0("MALDI/results/result_w",j,".csv"),
sep = "\t", quote = FALSE,
      colnames = TRUE, append = TRUE)
  }
}
```

Luego se quitan las filas intercaladas desde los archivos `result_w#.csv`, y los objetos de la transformación son almacenados como `subset_w#.csv`.

```
#escribiendo subsets 1:7 en 7 archivos subset.i.csv en la carpeta subset_sink
file.sink_2 <- list.files("MALDI/results", pattern="*.csv",full.names=TRUE)
data.wrap_2 <- lapply(file.sink_2, read.delim)
#ejecutar una sola vez - append está activado
for(j in 1:7){
  gdata::write.fwf(as.data.frame(dplyr::filter(as.data.frame(data.wrap_2[j]),
Entry != "Entry")),
    file = paste0("MALDI/subset_sink/subset_w",j,".csv"), sep
=" \t", quote = FALSE,
    colnames = TRUE, append = TRUE)
  #asignando a objeto
assign(paste0("subset",j),as.data.frame(dplyr::filter(as.data.frame(data.wrap_2[j]
), Entry != "Entry")))
}
```

Para finalizar, y agilizar su exportación a `.xlsx` se agregó la columna de consulta. El título de la columna corresponde al tratamiento. Los resultados luego son almacenados como `final_w#.csv`.

```
#verificando integridad
str(mz_obj2)
#levels(as.factor(d.M.labels))
#agregando queries (consultas) de cada m/z de cada tratamiento
file.sink_3 <- list.files("MALDI/subset_sink", pattern="*.csv", full.names=TRUE)
data.wrap_3 <- lapply(file.sink_3, read.delim)
#mejorando nombres
cnm <- c("Entry","Entry.name","Status","Protein.name","Gene", "Species",
"Length","Sequence","Calculated.Mass","Monoisotopic.Mass","Isoelectric.Point")
data.wrap_3 <- lapply(data.wrap_3, setNames, nm = cnm)
#almacenando resultados
for (j in 1:7){
gdata::write.fwf(cbind(as.data.frame(mz_obj2[j]),as.data.frame(data.wrap_3[j])),
file = paste0("MALDI/query.results/final_w",j,".csv"), sep
="\t", quote = FALSE,
colnames = TRUE, append =TRUE)
}
```

El contenido de estos archivos está representado en las tablas del análisis UNIPROT mencionado en la sección “Búsqueda de m/z en UNPROT”. Una vez almacenados los datos en `final_w#.csv` estos son agrupados nuevamente para su representación gráfica en un *heatmap* (mapa de calor).

```
file.sink_4 <- list.files("MALDI/subset_sink",
pattern="*.csv",full.names=TRUE)
data.wrap_4 <- lapply(file.sink_4, read.delim)

matrixsink<-matrix(, nrow = 0, ncol = 7)
reportsink<-list()
cbindsink<-list()
sink2<-matrix(,ncol = 7)
for (i in 1:7) {
matrixsink[i]<-as.vector(as.data.frame(data.wrap_4[i]) [1])
reportsink[[i]]<-table(unlist(as.vector(matrixsink[i])))
cbindsink[[i]]<-cbind(as.data.frame(reportsink[i]))
sink2[i]<-as.data.frame(cbindsink[i]) [1]
}
```

Posteriormente es generada una matriz de ceros y unos para representar la detección de proteínas candidatas.

```
uniquerownames<-as.data.frame(unique(unlist((sink2))))
#boilerplate
merge1<-merge(cbindsink[1], cbindsink[2], all = TRUE, by = c('Var1'))
merge2<-merge(merge1, cbindsink[3], all = TRUE, by = c('Var1'))
merge3<-merge(merge2, cbindsink[4], all = TRUE, by = c('Var1'))
merge4<-merge(merge3, cbindsink[5], all = TRUE, by = c('Var1'))
merge5<-merge(merge4, cbindsink[6], all = TRUE, by = c('Var1'))
mergefinal<-merge(merge5, cbindsink[7], all = TRUE, by = c('Var1'))
#nombres de columnas
colnames(mergefinal)<-
c("Protein.Entry", "CAR", "CAR.CuNPs", "Control", "IPR", "IPR.CuNPs", "CuNPs", "
CuONPs")
#reemplazando NA con 0
mergefinal[is.na(mergefinal)] <- 0
#homologando 1
mergefinal <- mergefinal %>% mutate_if(is.numeric, ~1 * (. > 0))
#nombres de filas
rownames(mergefinal)<-as.vector(as.matrix(mergefinal[1]))
#verificación
str(mergefinal)
```

Finalmente es realizada la representación gráfica utilizando el paquete pheatmap.

```
#representación gráfica
#heatmap(as.matrix(mergefinal[2:8]), Rowv = NA, scale = "none")
pheatmap(t(mergefinal[2:8]), main="Expression Heatmap",
         color = colorRampPalette (c ("white", "red")) (5),
         cluster_cols=F, cluster_row=T,
         fontsize=14, border_color=TRUE, scale = "none",
         legend = FALSE, cellwidth = NA, cellheight = NA)
```