



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Iztacala



“Determinación del Efecto de la Alfalfa en el Cambio
de la Estructura de la Comunidad de Bacterias
Cultivables Tolerantes al Combustóleo.”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA
PRESENTA:
ANA CAROLINA GUERRERO CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA

Los Reyes Iztacala, Edo. México. Junio 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres no sólo por apoyar todas mis decisiones, buenas o malas, sino por animarme a equivocarme, levantarme y aprender, dejarme hacer lo que más me gusta sin oponerse.

A Gabo, mi hermano, mi super héroe, por ser la mejor persona que conozco y un gran ejemplo de fuerza e inteligencia. Porque siempre está ahí para mí como mi mejor amigo y mi confidente. Gracias por todo Gabote!

A la bandota Chávez y a la Guerrero, por creer en mí y echarme porras a lo largo de este largo proceso, gracias a todas las tías, tíos, primas, primos, gracias a tod@s.

Al Profe Chava, por ser mi padre académico y desde el inicio de la carrera ayudar a formarme como la bióloga que soy ahora, por su tiempo y sus consejos y sobre todo por su gran paciencia! Muchas gracias profe!

A mi "bandita del 2", por hacer de la carrera una de las mejores experiencias de mi vida.

A mis piratas! Dianita, Yuris, Mayen y Bre, por enseñarme que hasta en los malos momentos podemos sacar lo mejor de nosotras y crecer juntas.

A la BANDA MICRO por demostrarme que la ñoñósfera es más que hablar de biología, por compartir sus dudas y ayudar a resolver las mías, por enseñarme a hablar en doble sentido y que la paciencia se trabaja día con día je (si si, ya no me enojo porque me arrugo).

A Laura, Candis, Sandra y Tere por adoptarme en el laboratorio y ser mi "familia académica". Las quiero mucho.

Al profe Ramón por ser nuestro coach dentro y fuera de la cancha, por enseñarme que el ejercicio y la "competencia sana" también son parte importante de la vida, más cuando se comparte con los amigos.

A los miembros del jurado por su paciencia infinita y su apoyo incondicional.

Dra. Rosario Sánchez Rodríguez

Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar

Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza

Dr. Elías Piedra Ibarra

Dr. Alfonso Lugo Vázquez

.....What we observe is not nature itself, but nature exposed
to our method of questioning –Werner Heisenberg-

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	6
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	7
Materiales y métodos	
Toma de muestra del suelo.....	7
Contaminación del suelo.....	9
Cultivo de bacterias.....	11
Biomasa total de las plantas.....	12
Análisis estadísticos.....	12
Resultados.....	14
Discusión.....	28
Conclusión.....	33
Bibliografía.....	34
Anexos.....	40



Resumen

La contaminación por derrames de hidrocarburos modifica la diversidad microbiana y selecciona a las especies vegetales tolerantes a las modificaciones del suelo. Por ello, la fitorremediación aprovecha estas plantas para hacer más eficiente la degradación de los hidrocarburos, ya que los exudados de la raíz estimulan la actividad microbiana. Por lo que se estableció la siguiente pregunta, ¿cuál es el efecto de la alfalfa en el cambio de la estructura de la comunidad de bacterias cultivables tolerantes al combustóleo?, y la hipótesis planteada fue: Si la alfalfa favorece a las especies de bacterias tolerantes al combustóleo, entonces, habrá más especies tolerantes en el suelo contaminado con planta que en el suelo contaminado sin ésta. El diseño experimental, en condiciones de microcosmos, consistió de 6 tratamientos con 3 repeticiones cada uno y en 3 tiempos. Los tratamientos fueron suelo (S), suelo combustóleo (SC), suelo planta (SP), suelo combustóleo y planta (SCP), hexano (H) y hexano planta (HP). El análisis de Similitud de Sørensen mostró que las comunidades SP, SCP y el H son diferentes al día 60, pues compartieron menos del 50 % de información con los otros grupos. Estas comunidades aún no se recuperaban ya que son diferentes del suelo control. Sin embargo, a los 90 días se formó un encadenamiento de los tratamientos con parecidos entre 60% y 95% de S, SC, SCP y el H. Este encadenamiento muestra una recuperación considerable de las comunidades. El HP formó una comunidad completamente diferente a los demás tratamientos. Por lo anterior se concluye que la alfalfa favoreció el establecimiento de la comunidad de bacterias tolerantes no sólo al combustóleo, sino que también ayudó a las bacterias tolerantes al hexano.



INTRODUCCIÓN

El suelo es muy complejo en su estructura y función debido a la forma en que se acoplan los componentes biológicos y minerales, los que en conjunto generan las diferentes regiones funcionales. La heterogeneidad y la estratificación del suelo hacen aún más difícil el estudio de los organismos que lo habitan y, por lo tanto, el conocimiento de los procesos biológicos que se llevan a cabo en él es limitado (Rodríguez-Zaragoza 2005). Tiene una función importante en la biósfera con la mayor cantidad de flujo de carbono y nutrientes mediados por organismos del suelo (Wolters *et al.* 1996).

Los organismos del suelo se agrupan en mesofauna (pequeños invertebrados, tales como artrópodos, anélidos, nematodos y moluscos), microfauna (protozoos, rotíferos y algunos nematodos) y microflora (bacterias, hongos y algas). Los microorganismos intervienen en una gran cantidad de procesos edáficos, principalmente en la degradación y síntesis de compuestos orgánicos (Porta *et al.* 1999). Además, la actividad microbiana es la fuerza motriz del reciclaje de nutrientes que ocurre en el suelo. La mayor parte del flujo energético y las transformaciones que sufren los diferentes nutrimentos en la mayoría de los ecosistemas, provienen de la actividad microbiana (Atlas *et al.* 1991) Las funciones de los microorganismos del suelo se retroalimentan por sus interacciones y asociaciones de las redes tróficas; donde un grupo de organismos utiliza los productos residuales del eslabón anterior, esto hace que dichas redes aprovechen mejor la energía contenida en la biomasa (Porta *et al.* 1999).

Los contaminantes, entre los que están los hidrocarburos derivados del petróleo, causan alteraciones en las propiedades químicas, físicas y biológicas de los suelos (Sangabriel *et al.* 2006).

Leahy *et al.* (1990) mencionan que esta liberación de hidrocarburos produce una relación excesivamente alta de carbono/nitrógeno (mayor de 20:1), que es desfavorable para el crecimiento microbiano. El ajuste de esta relación (C/N) con la adición de nitrógeno proporcionado por la simbiosis entre una leguminosa (como la alfalfa) y las bacterias fijadoras de nitrógeno estimula la biodegradación del petróleo crudo. El crecimiento de la mayoría de las bacterias heterótroficas es favorecido por un pH cercano a 7.



El nitrógeno (N_2) es el elemento que se encuentra en forma libre (estado gaseoso) y en mayor abundancia en la atmósfera (78 %). Se necesita de una gran cantidad de energía para desdoblarlo y combinarlo con otros elementos como el carbono y el oxígeno. Esta ruptura puede hacerse por bacterias que usan enzimas. Estas bacterias viven libres en el suelo o en simbiosis, formando nódulos con las raíces de ciertas plantas (leguminosas) para fijar el nitrógeno.

En cuanto a las plantas, solamente existen dos formas de nitrógeno que son asimilables: el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+). Las raíces pueden absorber ambas formas, aunque pocas especies prefieren absorber nitratos que amoniaco. El amonio es convertido a nitrato gracias a los microorganismos por medio de la nitrificación. La transformación se da más rápida cuando el pH está entre los 5.5-6.5; asimismo, este proceso se ve completado de dos a cuatro semanas. Esta fase es realizada en dos pasos: primero, las bacterias convierten el amonio en nitrito (NO_2^-), luego oxida el nitrito en nitrato. La nitrificación les entrega energía a las bacterias. Gracias a este proceso es que se da el efecto rizosférico que determina la estructuración de la comunidad (CICEANA-CICLO DEL NITRÓGENO).

Por otro lado, los derrames de hidrocarburos en los cuerpos de agua y en el suelo son muy frecuentes y el manejo inadecuado, ya sea en los tanques de almacenamiento o en accidentes en los vehículos que transportan hidrocarburos produciendo derrames que afectan negativamente las propiedades del suelo, lo que conlleva a que los cultivos vegetales no logren establecerse por la presencia del combustible.

Las emergencias ambientales ocurridas en México han ocasionado lamentables daños al ambiente, según la PROFEPA (2010) el combustóleo es una de las principales sustancias derivadas de los hidrocarburos involucradas en el 5.39 % de emergencias ambientales en nuestro país. El combustóleo está constituido por una mezcla compleja de hidrocarburos: parafinas (n-alcanos, alcanos ramificados, cicloalcanos), compuestos alquil monoaromáticos (tolueno, etilbenceno), poliaromáticos (hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH por sus siglas en inglés), fenantreno, pireno, naftaleno) y compuestos con nitrógeno y azufre (Sarmiento *et al* 2003, Ferrera-Cerrato *et al.* 2007).

Estos hidrocarburos causan alteraciones en las propiedades químicas, físicas y biológicas de los suelos (Sangabriel *et al.* 2006). En cuanto a las



características químicas, principalmente aumentan la materia orgánica (MO) y disminuyen el pH (Ortínez *et al.* 2003). Dentro de las propiedades físicas que afecta están: la estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados y el aumento de la retención del agua en la capa superficial disminuyendo potencial hídrico.

En términos generales, la contaminación del suelo por hidrocarburos derivados del petróleo tiene un efecto negativo en los ciclos de los nutrientes. Las poblaciones microbianas son inhibidas por este tipo de contaminación, pero los microorganismos que logran sobrevivir utilizan los hidrocarburos como una nueva fuente de carbono y aumentan su actividad metabólica aún bajo condiciones de estrés. La duración de estos efectos dependerá de la naturaleza de los hidrocarburos, la cantidad de los mismo, la duración de la exposición, la frecuencia con la que estos eventos ocurran, así como del tipo de suelo (Labud *et al.* 2007).

La mayoría de estos compuestos orgánicos pueden ser tóxicos para los microorganismos y como resultado, hay una pérdida en la actividad bioquímica esencial para la función del suelo; induciendo la selectividad y la disminución de la diversidad como la riqueza biológica (Rivera-Cruz *et al.* 2002). El mantenimiento de las funciones del suelo requiere una comprensión de la respuesta de las comunidades microbianas que desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas (Atlas *et al.* 1991) al estrés y a las perturbaciones. La disminución de la diversidad microbiana podría llevar también a una disminución en la estabilidad del suelo ante las fluctuaciones ambientales (Girvan *et al.* 2005). Estos atributos propician las fluctuaciones poblacionales de las bacterias autóctonas y realizan, de manera natural, la degradación química del petróleo en el suelo (Rivera-Cruz *et al.* 2002). Generalmente los microorganismos que tienen la capacidad de degradar los compuestos de los contaminantes son las bacterias.

Una de las estrategias para la remediación de suelos contaminados es la fitorremediación; la cual se define como el uso de plantas y su asociación con los microorganismos para la limpieza de sitios contaminados. Esta se basa en el uso del metabolismo de las plantas y los microorganismos de la rizósfera que degradan y secuestran contaminantes orgánicos e inorgánicos (Pilon-Smits 2005). El primer mecanismo que envuelve la fitorremediación de los hidrocarburos es



considerar que la biodegradación se incrementa por la estimulación de la actividad microbiana debido a los exudados de la raíz o efecto de la rizósfera (Joner *et al.* 2003; Xiaoyun *et al.* 2007; Tang *et al.* 2010).

Los microcosmos son importantes porque son una manera de estudiar los sistemas de manera simplificada y pueden ser reproducibles a bajo costo, son útiles para determinar qué pasa a las sustancias tóxicas en el sistema (Beyers *et al.* 1993).

La información sobre la composición de las poblaciones bacterianas en un sitio contaminado es de importancia para estimar la capacidad de auto depuración del sistema y la factibilidad de la descontaminación biológica si se considera la biorremediación (Allen *et al.* 2007, Said *et al.* 2008). La biodiversidad es una propiedad importante del suelo de la que depende su capacidad para recuperarse de las perturbaciones (Pankhurst *et al.* 1997). La biodiversidad de las comunidades microbianas es tal que hay un alto grado de redundancia en las especies presentes y, por lo tanto, un alto grado general de resiliencia en las funciones biológicas (Swift 1994, Finlay *et al.* 1997). Aunque la técnica de conteo en placa representa sólo el 1% total de los microorganismos del suelo, el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) se correlaciona de manera positiva con la actividad enzimática y respiratoria (Sanchez-Peinado *et al.* 2009) y se aplica para caracterizar la abundancia relativa de los grupos microbianos activos o potencialmente activos con ciertas funciones o requerimientos tróficos. (Néble *et al.* 2007). Aunque esta técnica enumera sólo las especies cultivables, es comúnmente utilizada porque es fácil, barata y nos da datos precisos y cepas de interés que nos permiten hacer comparaciones de la actividad microbiana y de sus poblaciones (Kim *et al.* 2006, Janssen 2006).

Medicago sativa es una leguminosa perene de raíces profundas que provee condiciones favorables para la actividad vital de la microflora del suelo bajo condiciones de contaminación, lo que ocasiona el uso exitoso de esta planta en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Nichols *et al.* 1997, Wiltse *et al.* 1998).



ANTECEDENTES

Nichols *et.al.* (1996) realizaron un estudio en una cámara de crecimiento para evaluar las poblaciones microbianas en suelo contaminado y no contaminado usando alfalfa (*Medicago sativa* L.) y una gramínea (*Poa alpina* L.) encontrando un mayor número de poblaciones degradadoras de químicos en el suelo rizosférico contaminado, lo que sugiere un potencial de estimulación de biorremediación alrededor de las raíces de las plantas.

Sangabriel *et.al.* (2006) realizaron un estudio para evaluar la tolerancia y el crecimiento de tres leguminosas y tres gramíneas en suelo contaminado con combustóleo, así como su capacidad de reducir el contenido de hidrocarburos provenientes del mismo. *Phaseolus coccineus* fue la única leguminosa con tolerancia y crecimiento en suelo contaminado mientras que las tres gramíneas no fueron afectadas. La población rizosférica de bacterias y hongos fue diferencialmente afectada por la presencia del contaminante con la planta. La degradación de combustóleo evaluada cualitativamente por GC-MS en *P. coccienus* fue similar a la observada en suelo contaminado sin planta.

Cortés-Pérez (2009) determinó el cambio de la comunidad de amebas desnudas en un suelo de cultivo contaminado con combustóleo comparado con un suelo no contaminado. Hubo una reducción de la riqueza de especies de amebas después de la contaminación con combustóleo, los gremios alimentarios que dominaron en ambos suelos fueron el bacterívoro y el omnívoro.

Mondragón-Camarillo (2011) determinó como influyen el combustóleo y *M. sativa* en la estructura trófica de la comunidad de ciliados y flagelados en un suelo de cultivo. Encontró que los protozoos fueron más abundantes en los tratamientos con *M. sativa*, que el combustóleo reduce la complejidad de las redes tróficas del suelo al haber menos grupos tróficos y que aumenta la abundancia del grupo bacterívoro en los tratamientos con combustóleo, lo que sugiere que la comunidad de protozoos se alimenta de bacterias tolerantes y degradadoras de hidrocarburos.

Cortés-Pérez *et al.* (2014) determinaron el efecto de *M. sativa* en la estructura trófica de las amebas desnudas después de un pulso de contaminación (50'000 ppm de combustóleo) identificando las especies al día 1, 30 y 60 después de la contaminación. El grupo bacterívoro fue



el más diverso en todos los microcosmos. La cantidad de amebas fue significativamente mayor en el suelo con planta que en los que no tenían planta a los 30 días.

Por lo anterior se estableció la siguiente pregunta de investigación, ¿cuál es el efecto de la alfalfa en el cambio de la estructura de la comunidad de bacterias cultivables tolerantes al combustóleo? La hipótesis planteada es: Si la alfalfa favorece a las especies de bacterias tolerantes al combustóleo, entonces, habrá más especies tolerantes en el suelo contaminado con planta que en el suelo contaminado sin planta.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de *Medicago sativa* (alfalfa) en el cambio de la estructura de la comunidad de bacterias cultivables tolerantes al combustóleo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- *Determinar la abundancia bacteriana por diluciones seriales.
- *Realizar cultivos axénicos.
- *Generar Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs) a partir de las cepas aisladas.
- *Obtener el pH, porcentaje de materia orgánica y concentración de nitratos, nitritos y amonio en el suelo.
- *Realizar un análisis de Similitud de Sørensen por medio del programa PC ORD ver. 6,0 para Windows para comparar la similitud de la estructura de la comunidad de bacterias en los diferentes microcosmos.

MATERIAL Y MÉTODO

1. TOMA DE MUESTRA DEL SUELO

1.1 Zona de estudio

El Municipio de Jalacingo está ubicado en la zona centro del Estado de Veracruz, en las coordenadas 19°48' N y 97°18' W, a una altitud de 1944 msnm (Fig.1). Limita al Norte con el municipio de Tlapacoyan; al Este con Atzalan y Altotonga; al Sur con Perote; al Oeste con el Estado de



Puebla. Su distancia aproximada al Noroeste de la capital del Estado es de 65 km por carretera. El clima del municipio es templado-húmedo con una temperatura promedio de 13.9 °C; la precipitación promedio anual es de 2,029.5 mm. El suelo es de tipo andosol, feozem y luvisol, el primero se ha formado a partir de ceniza volcánica, el segundo tiene una capa superficial rica en materia orgánica, es oscura, y el tercero se caracteriza por su acumulación de arcilla en el subsuelo. El mayor porcentaje de esta superficie se utiliza en agricultura y ganadería <http://oc4jver.veracruz.gob.mx/Municipios/municipio?ciudad=30086&seccion=economicaXXV>.

En este sitio se seleccionó un parcela, la cual está situada en el Ejido Orilla del Monte, 19°35'16'' latitud N y 97°21'06'' longitud W, a una altitud de 2410 msnm, en la carretera pavimentada de Los Húmeros a Perote. Colinda al Norte (98.64 m) con la carretera pavimentada de Los Humeros, al Sureste (229.06 m) con la parcela 871, al Suroeste (97.15 m) con el ejido Frijol Colorado, al Noroeste (230 m) con la parcela 858.



Figura 1. Ubicación geográfica del municipio de Jalacingo, Veracruz.

1.2 Muestras de suelo

La textura del suelo de la parcela seleccionada es franco arenoso (60 % arena, 30 % limos, 10 % arcilla), con pH ligeramente ácido (6.6) (Sangabriel *et al.* 2006) y 3.1 % de materia orgánica sin vegetación ni contaminantes. Se tomó suelo de 6 lugares diferentes de la parcela con un muestreo de tipo zigzag, a una profundidad de 0 a 15 cm, el suelo se tamizó con una abertura de malla de 2 mm de diámetro y se homogenizó para así obtener una muestra compuesta de la parcela (Margesin *et al.* 2005, Smith *et al.* 2006). El suelo de la muestra



compuesta se depositó en una bolsa de polietileno autosellable, la cual se transportó al laboratorio de Microbiología en la UBIPRO, FES Iztacala y se almacenaron a 4 °C hasta su uso (Margesin *et al.* 2005).

1.3 Preparación del extracto de suelo

El extracto de suelo (solución madre) se preparó con 200 g de suelo libre de combustóleo que se homogenizó con 1 litro de agua destilada, se colocó en baño maría a 60 °C durante 2 h, se filtró, se esterilizó y refrigeró a 4 °C para su posterior uso (Nerad *et al.* 1992, Mondragón-Camarillo 2011).

El medio de cultivo se preparó con extracto de suelo con el fin de proveer a las bacterias cultivables de condiciones nutrimentales semejantes al suelo de donde fueron extraídas.

1.4 Análisis del suelo

Se midió el pH (10 g peso seco: 35 ml agua destilada), materia orgánica (MO) por el método de Walkley y Black (Muñoz-Iniestra *et al.* 2012) y se realizó la cuantificación por colorimetría de nitratos, nitritos y amonio presentes en el suelo (Kassem *et al.* 1995) (Anexo).

2. CONTAMINACIÓN DEL SUELO

2.1 Montaje de Microcosmos

Los microcosmos se usaron para determinar la influencia de la zona de raíces en el crecimiento microbiano y en la degradación de combustóleo.

Montaje de microcosmos de suelo desnudo (S): se pesaron 300 g de suelo (peso seco) y se depositaron en un recipiente (12 cm de diámetro por 14.5 cm de altura) con tapa perforada, se agregó extracto de suelo estéril (1:10) hasta llegar al 60 % de la Capacidad de Campo (CC).

Montaje de microcosmos de suelo con planta (SP): Se procedió de la misma forma que en el tratamiento anterior y se agregaron 50 semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) inmediatamente después de llevar el suelo al 60 % de su CC.

Montaje de microcosmos de suelo con combustóleo (50'000 ppm) (SC): En un recipiente (12 cm de diámetro por 14.5 cm de altura) se agregaron 75 ml de hexano y después 15 g de combustóleo para



hacerlo menos viscoso y posteriormente se mezclaron 300 g de suelo (peso seco) para que la contaminación con el hidrocarburo fuera lo más homogénea posible. Se dejaron reposar 24 h sin tapa para que se volatilizara el hexano y después de este tiempo se agregó extracto de suelo estéril (1:10) hasta llegar al 60 % de la CC.

Montaje de microcosmos de suelo con combustóleo (50'000 ppm) y planta (SCP): Se procedió de la misma forma que en el tratamiento anterior y se agregaron 50 semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) inmediatamente después de llevar el suelo al 60 % de su CC.

Montaje de microcosmos de suelo con hexano (H): En un recipiente (12 cm de diámetro por 14.5 cm de altura) se agregaron 75 ml de hexano y posteriormente se mezclaron los 300 g de suelo (peso seco). Se dejaron reposar 24 h sin tapa para que se volatilizara el hexano y después de este tiempo se agregó extracto de suelo estéril (1:10) hasta llegar al 60 % de la CC.

Montaje de microcosmos de suelo con hexano y plata (HP): Se procedió de la misma forma que en el tratamiento anterior y se agregaron 50 semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) inmediatamente después de llevar el suelo al 60 % de su CC.

Los microcosmos se mantuvieron bajo condiciones de invernadero en la FES Iztacala. Estas condiciones se mantuvieron durante 90 días, tomando el día 1 a partir de que todos los microcosmos estaban hidratados al 60 % de su CC (Banerjee *et al.*, 1992 Kim *et al.* 2006). Cada microcosmos fue desechado después de muestrearse.

Se determinó la capacidad de campo (CC) del suelo por goteo y este dato sirvió como base para mantener los microcosmos con un contenido de humedad alrededor del 60 % de la CC durante todo el periodo de estudio.

2.2 Diseño experimental

Se procesaron 54 microcosmos. El diseño experimental consistió de 6 tratamientos y 3 repeticiones en 3 tiempos (30, 60 y 90 días). Los tratamientos fueron suelo (S), suelo con combustóleo (SC), suelo con planta (SP), suelo con combustóleo y planta (SCP) y también se probó el efecto del hexano (H) y del hexano con planta (HP) en condiciones de microcosmos.



2.3 Toma de muestra del microcosmo

La muestra de suelo, de los microcosmos sin planta, se tomó del centro del envase a 5 cm de profundidad; mientras que en los microcosmos con planta se extrajeron las plantas con raíz, se sacudió la tierra dentro del envase y luego se tomó el suelo adherido a las raíces de las plantas con ayuda de una espátula (Gobat *et al.* 2004). Todas las muestras de suelo se dejaron secar a temperatura ambiente.

3. CULTIVO DE BACTERIAS

3.1 Preparación del medio de cultivo

Se preparó un medio de cultivo con extracto de suelo (AES) 1:5 (ANEXO) y agar bacteriológico con el fin de semejar las condiciones del ambiente natural de crecimiento de las bacterias (Nerad *et al.* 1992).

3.2 Siembra de bacterias

Se tomó 1 g (peso seco) de cada muestra de suelo, las cuales se colocaron en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril, se agitaron en vórtex durante 5 min y se dejaron reposar 2 min. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} hasta 10^{-6} . Se tomaron alícuotas de 0.2 ml de las últimas tres diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) y se distribuyeron por triplicado en cajas petri con agar extracto de suelo. A partir de estas diluciones se hizo la estimación del número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (ANEXO) (Miles *et al.* 1938).

3.3 Determinación

La riqueza y frecuencia de la comunidad de bacterias cultivables se determinó a los 30, 60 y 90 días (M1, M2 y M3) del montaje de los microcosmos, usando el método de dilución y cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en agar extracto de suelo (Ferrera-Cerrato *et al.* 2007).

3.4 Caracterización morfológica de bacterias

Se aislaron diferentes formas coloniales de bacterias distinguiéndolas mediante la forma de crecimiento, borde, elevación, pigmentos en la colonia, pigmentos difusibles en el agar y producción de gotitas. Estas se cultivaron por estría cruzada en AES durante 15 días a temperatura ambiente. A los cultivos puros de bacterias se les realizó tinción de gram y se caracterizó su morfología microscópica, también la producción de



catalasa, movilidad y crecimiento en medio Rennie (ANEXO), ya que es un medio seleccionador de posibles fijadoras de nitrógeno al no contener nitrógeno reducido, y la capacidad de las bacterias para crecer en este medio es otra característica del genotipo de las bacterias.

3.5 Generación de Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs)

A partir de las características observadas en las diferentes cepas aisladas se realizó el análisis de similitud y con el programa Primer 6 se determinaron las diferentes UTOs. El criterio de agrupación que se tomó en cuenta fue el 90 % de similitud.

Se dividió la frecuencia de las UTOs en dominantes (>6), comunes (6-4) y raras (<4).

4. BIOMASA TOTAL DE LAS PLANTAS

4.1 Sobrevivencia de las plantas

Se contó el número de plantas vivas por tratamiento en cada muestreo. Se aplicó el criterio de emergencia de la radícula para considerar a una semilla como germinada. El desarrollo de las hojas secundarias se tomó como criterio de una planta establecida. Al estadio intermedio se le reconoció como plántula (Smith *et al.* 2006).

4.2 Determinación de biomasa vegetal

La determinación de la biomasa vegetal se realizó de la siguiente manera: se extrajo la planta del microcosmos, se lavó la raíz y se dejó secar a temperatura ambiente durante 72 h. Se obtuvo el peso seco de la raíz, tallo y hojas de las plantas cuya sumatoria arroja la biomasa total por planta y tratamiento (Smith *et al.* 2006).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se le aplicó el ANOVA con el programa XLSTAT a los parámetros físico-químicos para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Los datos de las UFC fueron normalizados mediante la determinación de sus valores logarítmicos, y se les aplicó un análisis de varianza y la prueba *post hoc* de comparación de medias de Tukey (HSD, $\alpha=0.05$), utilizando el programa XLSTAT (Ferrera-Cerrato *et al.* 2007).



Se realizó el análisis de Sørensen para determinar la similitud de las comunidades de los diferentes microcosmos. Mientras que, el análisis de correlación canónica de los parámetros físico-químicos y las UTOs se realizaron para determinar los factores que explicaran la mayor varianza en la estructuración de las comunidades. Ambos análisis se realizaron con el programa PC-ORD ver. 6 (Podani 1994).



RESULTADOS

pH

El pH fue ligeramente ácido, tendiendo a básico en todos los tratamientos a lo largo del experimento. El valor más alto fue el del hexano con planta en el día 90 (Tabla 1).

El combustóleo no modifica el pH del suelo ya que tiene valores parecidos a los del suelo sin contaminar (S) y al suelo contaminado con planta (SCP) (Tabla 1).

El suelo con planta (SP) fue el tratamiento con el pH más ácido (6.3-6.5) en los 3 muestreos, también con tendencia a la neutralidad pero sin llegar a ella. Esto posiblemente debido a que la respiración de las plantas acidifica el medio en el que se encuentra (Tabla 1).

El hexano también genera un cambio en el pH del suelo, pasando de la neutralidad a la basicidad cuando se junta con la planta (Tabla 1).

	S	SC	SP	SCP	H	HP
Día 30	6.63±0.04	6.98±0.05	6.51±0.14	6.86±0.11	6.91±0.55	7.09±0.12
Día 60	6.64±0.08 ^a	6.77±0.09 ^a	6.3±0.06 ^b	6.7±0.06 ^a	6.6±0.18 ^a	7.04±0.23 ^a
Día 90	6.93±0.23 ^b	7.14±0.08	6.77±0.01 ^b	6.95±0.22	7.17±0.16	7.35±0.19 ^a

Tabla 1. Valores de pH en los diferentes tratamientos y en los 3 muestreos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada periodo de tiempo (n = 3, alfa =0.05).



Materia Orgánica

El suelo (S) pasa de un porcentaje medio en el contenido de materia orgánica (2.14) a moderadamente rico (3.32 %); y en el tercer muestreo baja a un contenido medio (2.21 %). El suelo con combustóleo (SC) mantiene un porcentaje rico (6.35-9.21 %) a lo largo de los 3 muestreos; lo mismo sucede con el suelo con combustóleo y planta (SCP), el cual tuvo el mayor porcentaje de materia orgánica (8.7-10.25 %) en los 3 muestreos (Tabla 2) (López Galindo *et al.*, 2011).

El suelo con planta (SP) varía de un porcentaje moderadamente rico (2.5 %) a medio (2.14 %) y otra vez moderadamente rico (1.77 %) en el tercer mes, lo que se explica porque la raíz de la planta ayuda a homogenizar el suelo y para el tercer mes las raíces de las plantas habían formado una red en el suelo en la que casi no había espacio libre de la influencia de la raíz (Tabla 2).

El suelo con hexano tuvo un porcentaje medio de materia orgánica (2.35-2.44 %) (Tabla 2).

	S	SC	SP	SCP	H	HP
Día 30	2.14±0.84	6.34±1.55	2.51±2.18 ^b	8.7±1.28 ^a	2.36±1.42	1.7±1.11 ^b
Día 60	3.32±0.38	9.22±0.84 ^{ab}	2.14±1.72 ^{bc}	10.25±0.89 ^a	2.43±1.33	2.29±3 ^c
Día 90	4.28±3.99 ^b	7±1.85 ^a	4.35±3.55 ^b	6.56±4.16 ^a	2.8±0.26 ^b	2.21±0.63 ^b

Tabla 2. Porcentaje de Materia Orgánica (MO) en los diferentes tratamientos y en los 3 muestreos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada periodo de tiempo (n = 3, alfa =0.05)



Nitratos

La concentración de nitratos disminuyó con el tiempo y se registraron concentraciones menores en los tratamientos SP y SCP (Figura 2).

El suelo con hexano (H) del día 30 fue el tratamiento con la mayor concentración de nitrato ($142.22 \text{ mg/kg}^{-1}$). En el día 90 la cantidad de nitratos de los tratamientos con planta fue menor a 15 mg/kg^{-1} (Figura 2).

En el día 30 y 90 no hubo diferencias estadísticamente significativas, sin embargo en el día 60 hubo una diferencia estadísticamente significativa del suelo desnudo (S) con los demás tratamientos y del suelo con hexano (H) con el suelo con hexano y planta (HP) y el suelo con planta (SP). El suelo con planta (SP) y suelo con combustóleo y planta (SCP) tuvieron una diferencia en el día 30 con los otros 2 muestreos.

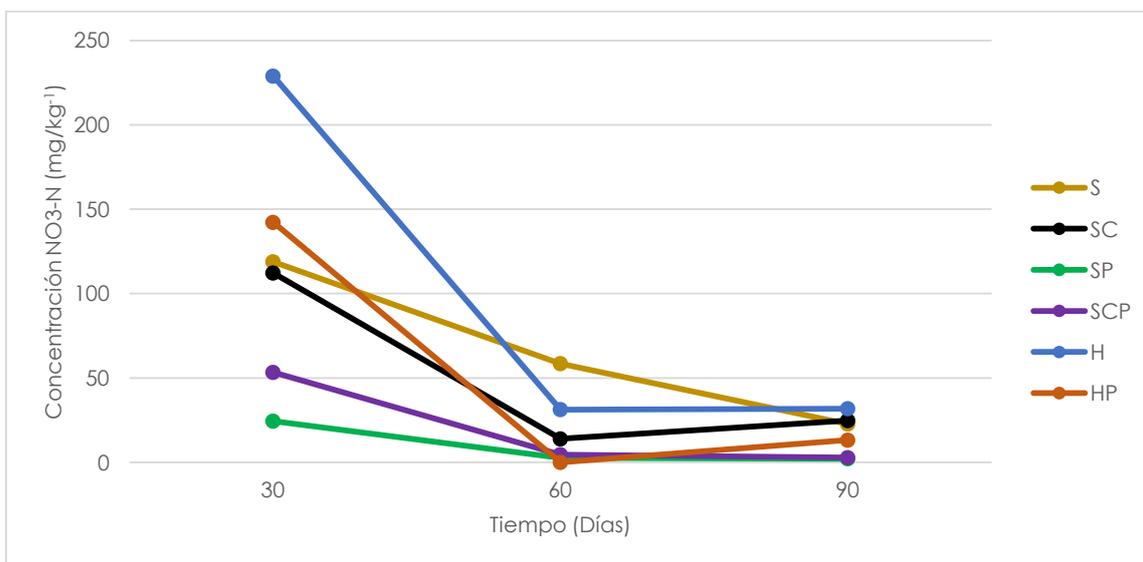


Figura 2. Concentración de nitrato (mg/kg^{-1}) en los diferentes tratamientos y en los 3 muestreos. ($n = 3$, $\alpha = 0.05$)



Nitrito

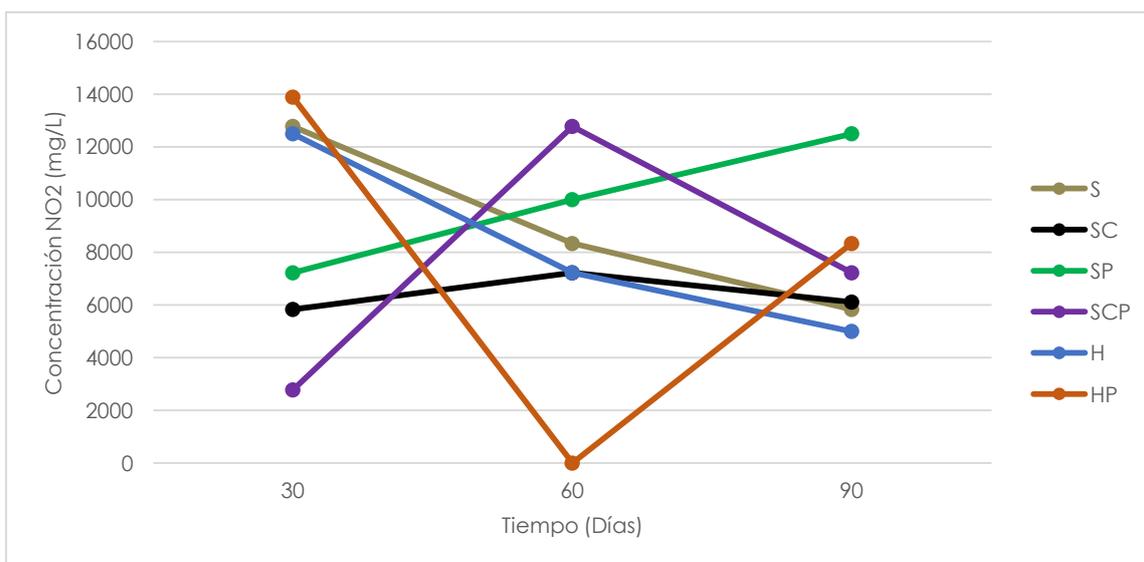


Figura 3. Concentración de nitrito (mg/L) en los diferentes tratamientos y en los 3 muestreos (n = 3, alfa =0.05)

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre los muestreos.

Amonio

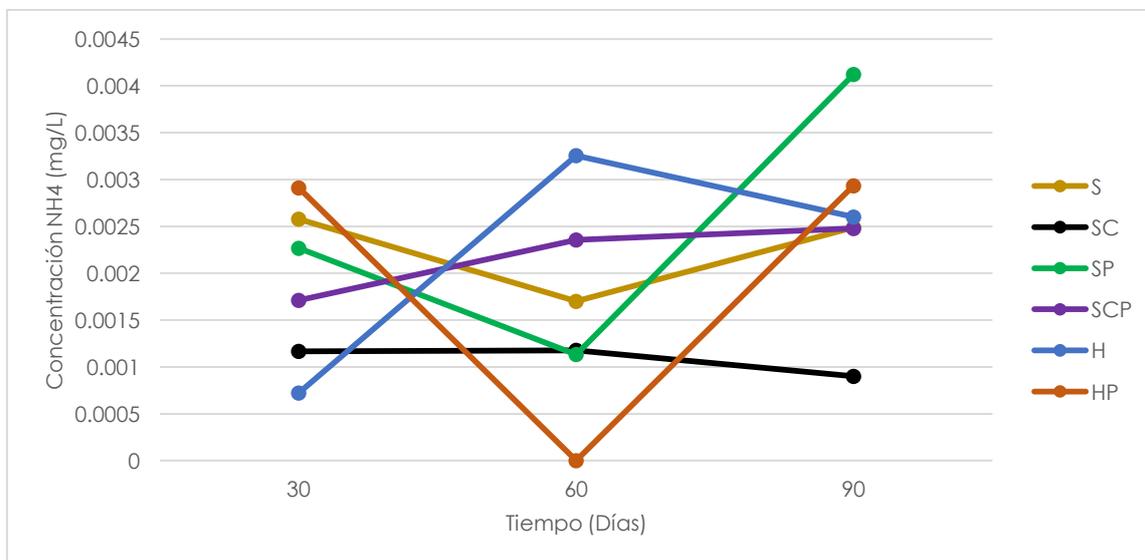


Figura 4. Concentración de amonio (mg/L) en los diferentes tratamientos y en los 3 muestreos. (n = 3, alfa =0.05)

Sólo se encontró una diferencia significativa en el suelo con planta (SP) del día 30 con el día 60 y 90.



DIVERSIDAD

Abundancia de Unidades Formadoras De Colonias (UFC)

Se obtuvo un total de 179 aislamientos durante el experimento (ANEXO), los cuales arrojaron 123 UTOs basados en las características morfológicas y bioquímicas de cada una de las colonias.

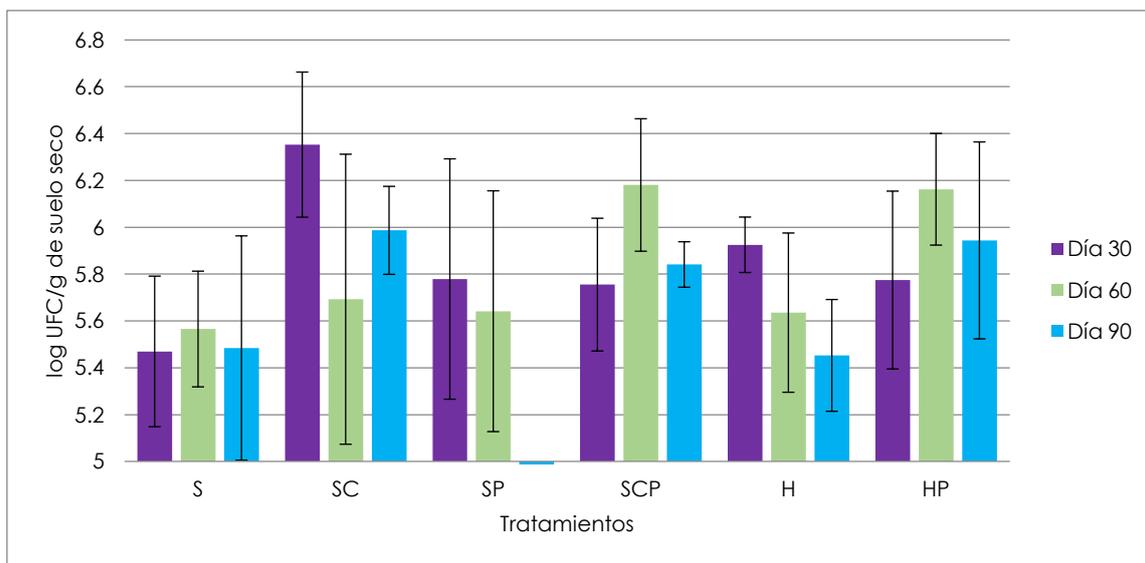


Figura 5. Logaritmo de la cantidad de UFC obtenidas en los diferentes tratamientos a lo largo de los 90 días. Las bacterias del Suelo con Planta (SP) fueron incontables en las 3 diluciones inoculadas del día 90 ($n = 9$, $\alpha = 0.05$, las barras indican la desviación estándar).

La cantidad de UFC varió entre los tratamientos, pero dicha variación sólo fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en el tratamiento de suelo con combustóleo (SC) del día 30 y 60 (Figura 5).

El suelo con combustóleo (SC) del primer mes mostró la mayor cantidad de UFC. Mientras que, el suelo (S) fue el tratamiento con menos UFC durante los 3 meses. La cantidad de UFC disminuyó con el tiempo en los tratamientos con hexano (H), hexano con planta (HP) y suelo con planta (SP) (Figura 5).

En el caso del tratamiento suelo sin contaminar (S), las UFC aumentaron muy poco con el tiempo; mientras que éstas bajaron en el suelo con combustóleo (SC) del primer al segundo muestreo y subieron para el tercer muestreo. Las UFC del suelo con combustóleo y planta (SCP) aumentaron en el segundo muestreo y disminuyeron en el tercero (Figura 5).



Riqueza de Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs)

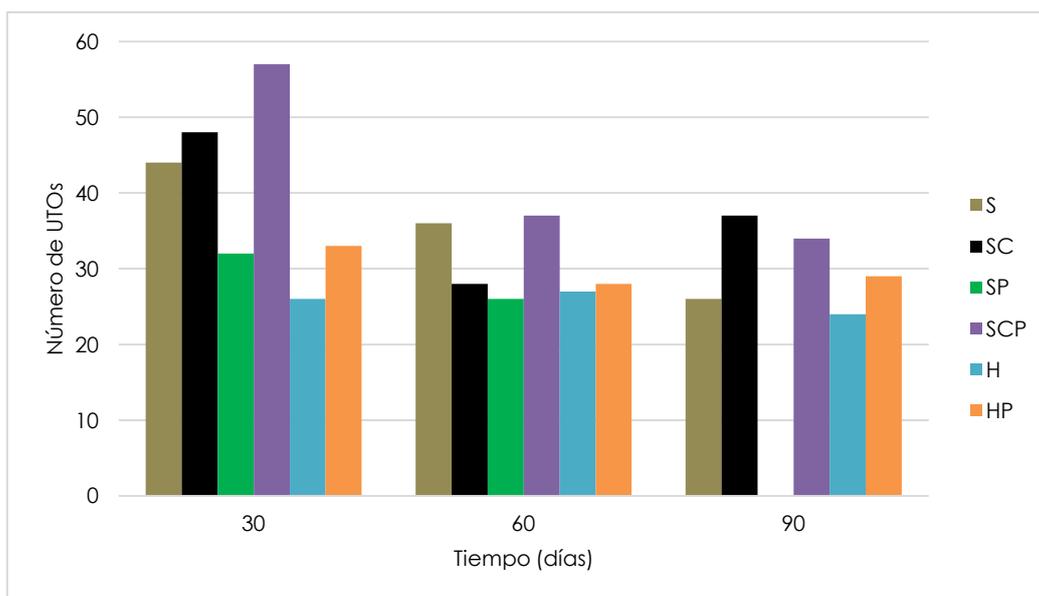


Figura 6. Riqueza de Unidades Taxonómicas Operativas encontradas en los diferentes tratamientos en los 3 muestreos (día 30, 60 y 90). Las bacterias del Suelo con Planta (SP) fueron incontables en las 3 diluciones inoculadas del día 90 (n = 9).

El suelo con combustóleo y planta (SCP) del día 30 presentó la mayor riqueza de UTOs (más de 50). El de menor riqueza fue el suelo con hexano (H) durante los 3 muestreos del estudio (Figura 6).

Se pueden ver 3 tendencias en la riqueza. La primera es una disminución en la riqueza de los tratamientos de suelo sin contaminante (S), suelo con planta (SP) y suelo con combustóleo y planta (SCP). La segunda fue una disminución inicial seguida de un aumento de la riqueza entre los días 60 y 90 en el suelo con combustóleo (SC) y el suelo con hexano y planta (HP). La tercera fue un aumento inicial y luego una disminución de la riqueza en el suelo con hexano (H) (Figura 6).



Frecuencias de Unidades Taxonómicas Operativas

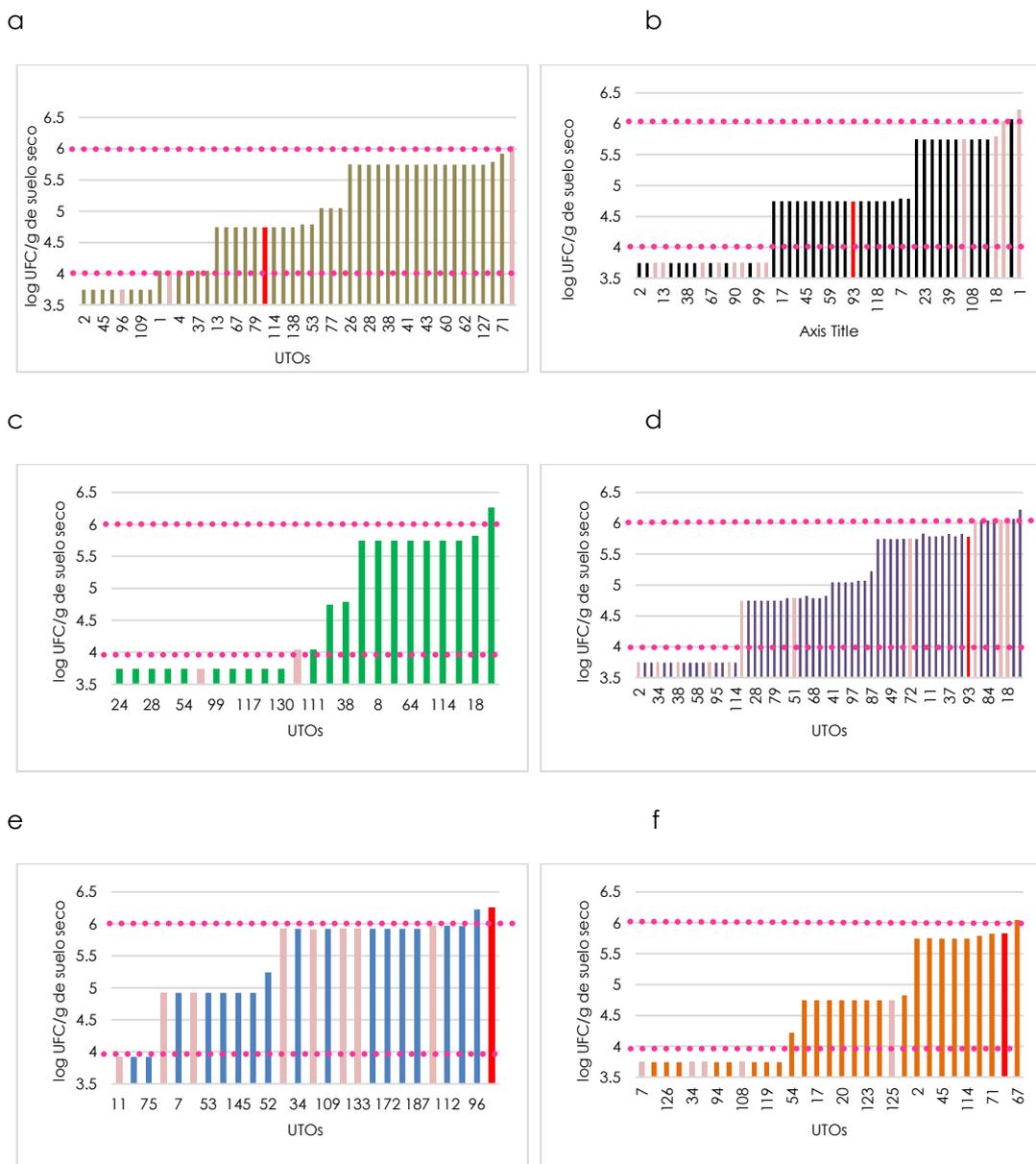


Figura 7. Frecuencia acumulada de UTOs encontradas en cada tratamiento en el día 30. a) suelo desnudo (S); b) suelo con combustóleo (SC); c) suelo con planta (SP); d) suelo con combustóleo y planta (SCP); e) suelo con hexano (H); f) suelo con hexano y planta (HP). La barra roja indica la UTO-93 y las claras las UTOs que cambiaron su frecuencia en el tiempo (n = 9). Las líneas punteadas indican las UTOs dominantes, comunes y raras.

Todos los tratamientos tienen UTOs dominantes (>6) pero hay gran abundancia de las comunes (4-6) y raras (<4) (Figura 7). El suelo con combustóleo y planta (SCP) tiene más UTOs dominantes que el resto de los tratamientos (Figura 7d).

Hay 2 tratamientos con curvas sigmoidales, el suelo (S) y el suelo con combustóleo y planta (SCP), lo que puede indicar que debido al



combustóleo y a las raíces de la planta hay una mayor diversidad de recursos. Hay 4 tratamientos con curvas hiperbólicas, el suelo con planta (SP); suelo con combustóleo (SC); suelo con hexano (H) y suelo con hexano y planta (HP) (Figura 7).

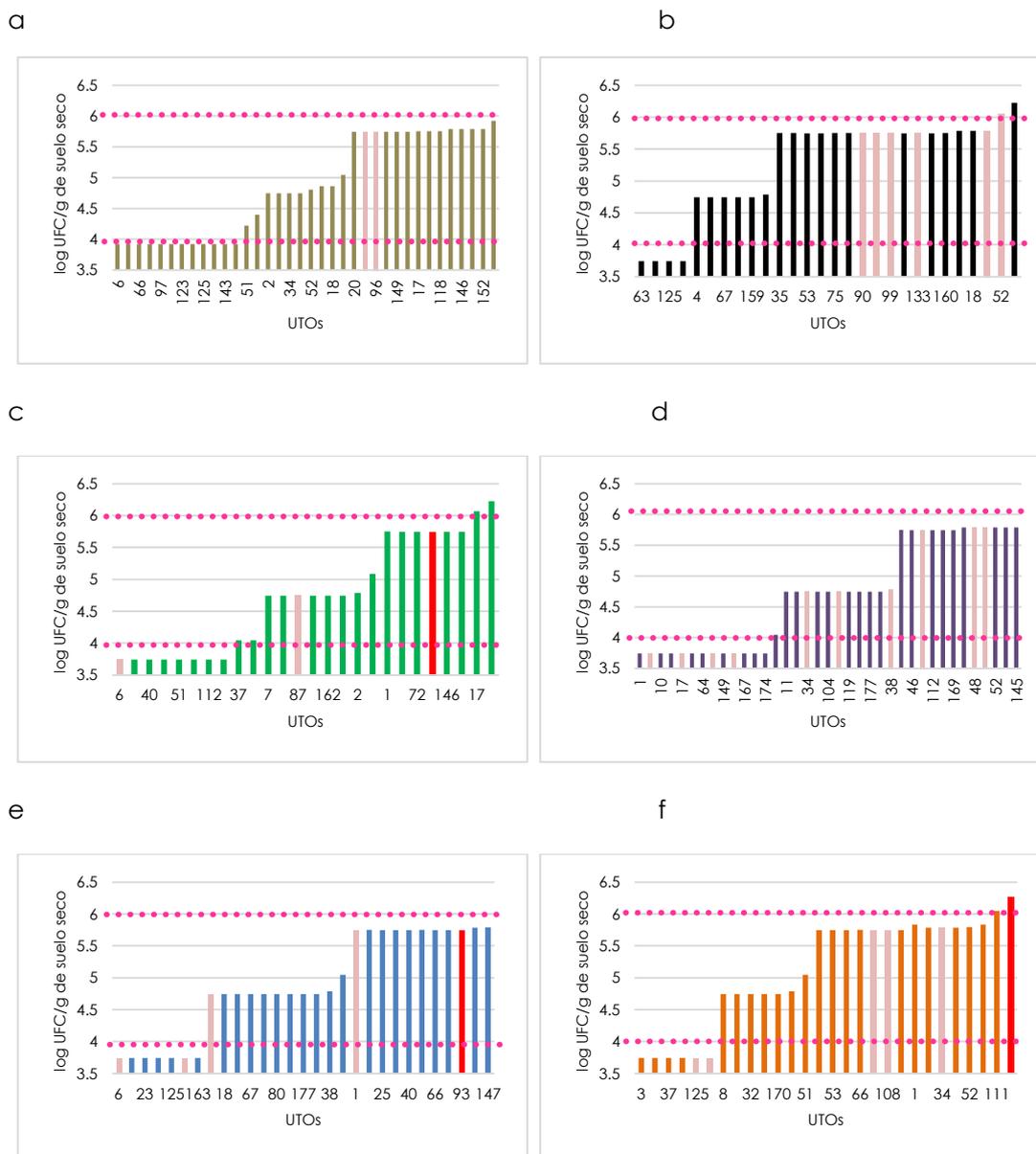


Figura 8. Frecuencia acumulada de UTOs encontradas en cada tratamiento en el día 60. a) suelo desnudo (S); b) suelo con combustóleo (SC); c) suelo con planta (SP); d) suelo con combustóleo y planta (SCP); e) suelo con hexano (H); f) suelo con hexano y planta (HP). La barra roja indica la UTO-93 y las claras las UTOs que cambiaron su frecuencia en el tiempo (n = 9). La barra roja indica la UTO-93 (n = 9). Las líneas punteadas indican las UTOs dominantes, comunes y raras.

El suelo con combustóleo (SC), el suelo con planta (SP) y suelo con hexano y planta (HP) tuvieron UTOs dominantes (>6), comunes (6-4) y



raras (<4), mientras que el resto de los tratamientos solo tuvieron UTOs comunes y raras.

Los tratamientos de suelo (S) y suelo con planta (SP) son los que presentaron curvas sigmoidales (Figura 8a y 8c), mientras que los demás tratamientos tuvieron una curva hiperbólica.

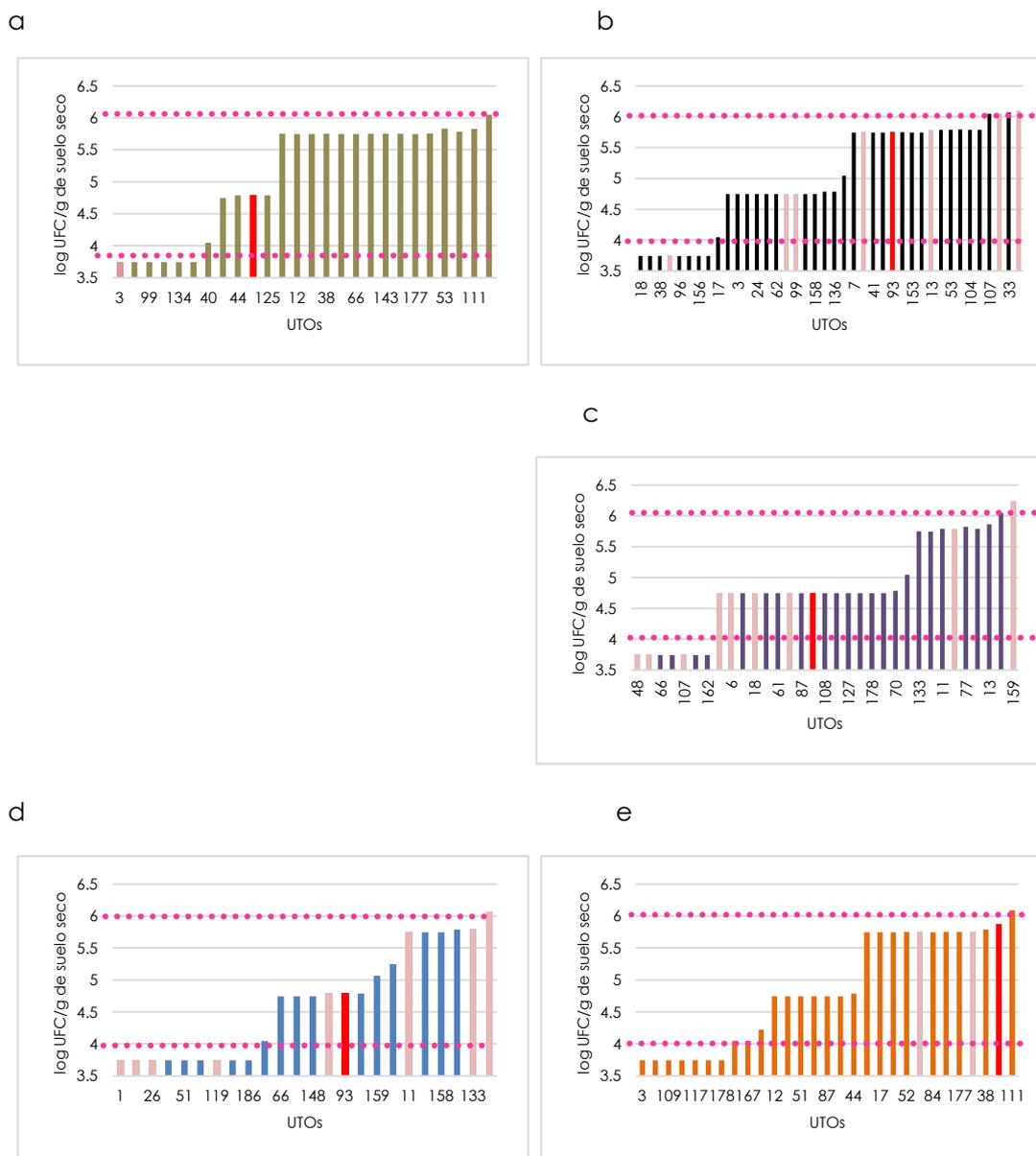


Figura 9. Cuentas de UTOs encontradas en cada tratamiento en el día 90. a) suelo desnudo (S); b) suelo con combustóleo (SC); c) suelo con combustóleo y planta (SCP); d) suelo con hexano (H); e) suelo con hexano y planta (HP). Las bacterias del Suelo con Planta (SP) fueron incontables en las 3 diluciones inoculadas del día 90. La barra roja indica la UTO-93 (n=9). La barra roja indica la UTO-93 y las claras las UTOs que cambiaron su frecuencia en el tiempo (n=9). Las líneas punteadas indican las UTOs dominantes, comunes y raras.



En este tercer mes los 2 tratamientos con hexano (suelo con hexano y planta (HP) y suelo con hexano (H)) son los que presentan una curva sigmoideal, mientras que los 3 tratamientos restantes (suelo (S), suelo con combustóleo (SC) y suelo con combustóleo y planta (H)) muestran una curva de tipo sigmoideo.

ANÁLISIS DE SIMILITUD DE COMUNIDADES

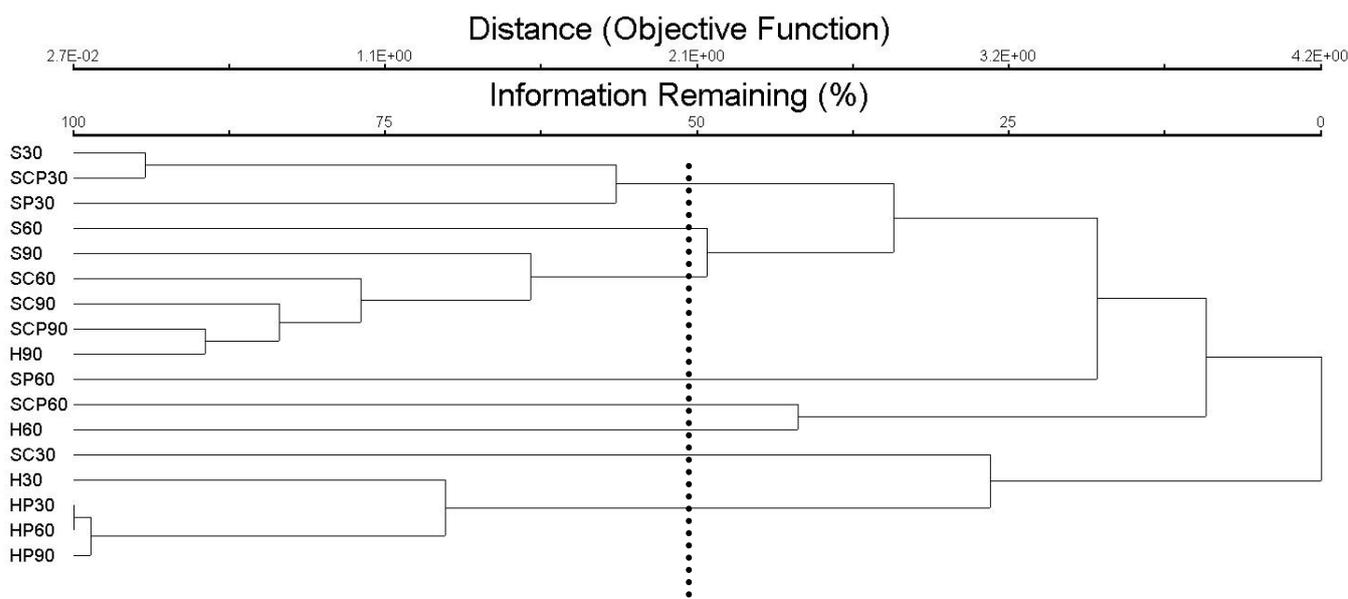


Figura 10. Dendrograma Similitud de Sørensen. La línea punteada marca el corte en el 50% de similitud entre los tratamientos a lo largo de los 3 muestreos para separar los grupos formados. Las bacterias del Suelo con Planta (SP) fueron incontables en las 3 diluciones inoculadas del día 90.

El análisis de Similitud de Sørensen ayudó a distinguir 3 grupos con más de 50 % de parecido entre ellos (Figura 10).

El primer grupo lo formaron el suelo (S), suelo con combustóleo y planta (SCP) y el suelo con planta (SP) del día 30.

En el segundo grupo se formó un gradiente, lo que provocó un encadenamiento de los tratamientos del suelo (S) del día 60 y 90, suelo con combustóleo (SC) del día 60 y 90, suelo con combustóleo y planta (SCP) del día 90 y el suelo con hexano (H) del día 90, y va agregando a los tratamientos hasta llegar a una similitud de 49.3 % entre todos ellos, lo cual implica que las comunidades se van restableciendo con el tiempo (Figura 10).

El tercer grupo estuvo formado por el suelo con combustóleo y planta (SCP) y el suelo con hexano del día 60, compartiendo 49.3 % de información.



En el suelo con hexano y planta (HP) de los tres períodos de tiempo se agruparon de manera independiente a los demás, compartiendo 100 % de información entre ellos y 70.26 % con el hexano (H) del día 30 (Figura 10).

El suelo con planta (SP) del día 60 y el suelo con combustóleo del día 30 no se agruparon con ninguno, ya que su similitud es menor al 50 % con todos los tratamientos.

Morfologías Microscópicas

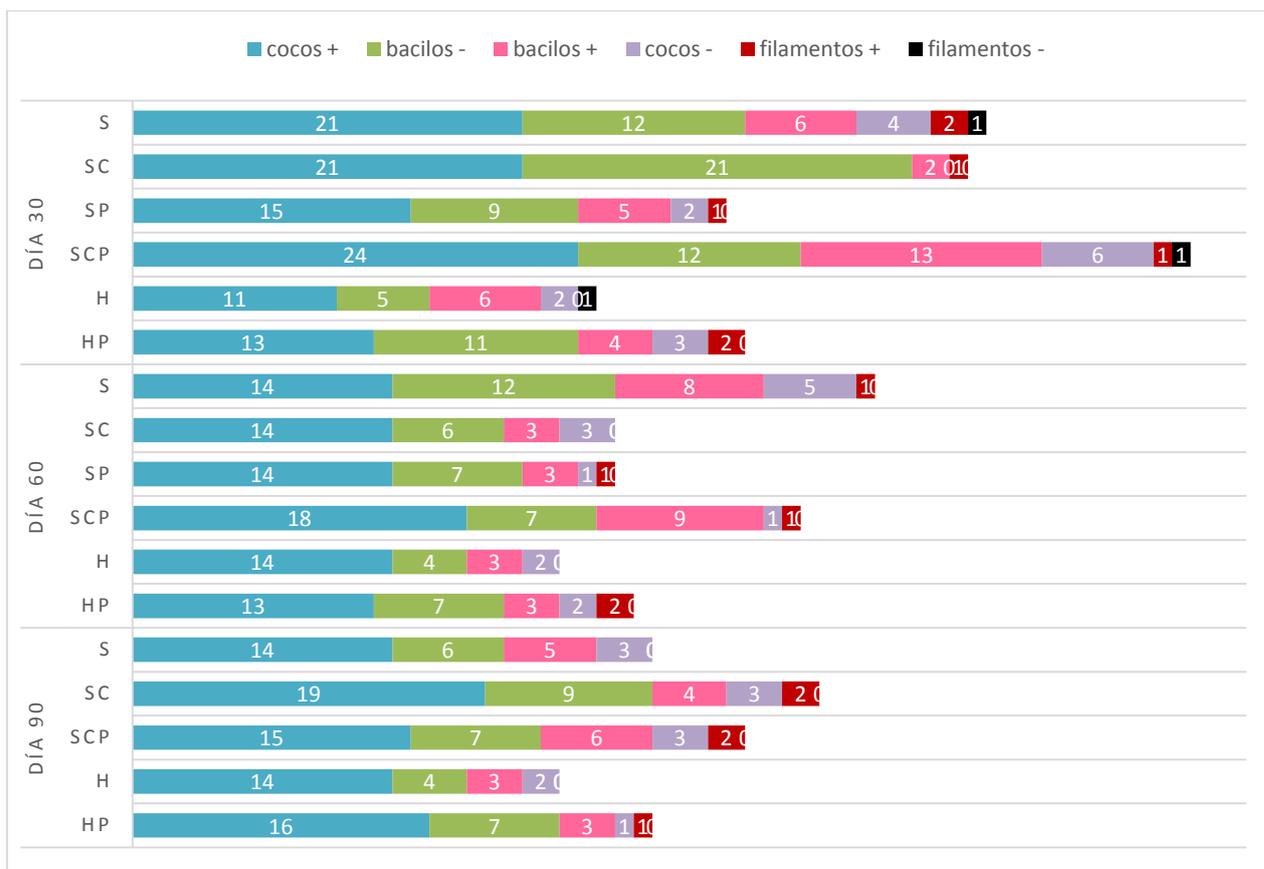


Figura 11. Morfologías microscópicas y Gram encontradas en las diferentes UTOs y su riqueza en los diferentes tratamientos en los 3 muestreos. Las bacterias del Suelo con Planta (SP) fueron incontables en las 3 diluciones inoculadas del día 90.

Se detectaron filamentos gram negativos sólo en el día 30 (S, SCP y H), mientras que en los días 60 y 90 no se detectó esta morfología (Figura 11).

En el día 30, las bacterias del suelo (S) y el suelo con combustóleo y planta (SCP) presentaron las 6 morfologías. Las bacterias del suelo con hexano (H), hexano con planta (HP) y el suelo con planta (SP) presentaron 5 morfologías y del suelo con combustóleo (SC) sólo 4



(cocos +, bacilos -, bacilos + y filamentos +). La morfología más común en todos los tratamientos fue el coco + y después el bacilo -.

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN CANÓNICA

El análisis de correlación canónica entre las comunidades de los diferentes tratamientos y las variables físico-químicas, evidenció que la Materia Orgánica explica el 13.9% (MO) y el pH el 24.3% y son los factores que tienen la mayor influencia (32.8%) en la estructuración de la comunidad de algunos de los tratamientos (Figura 12).

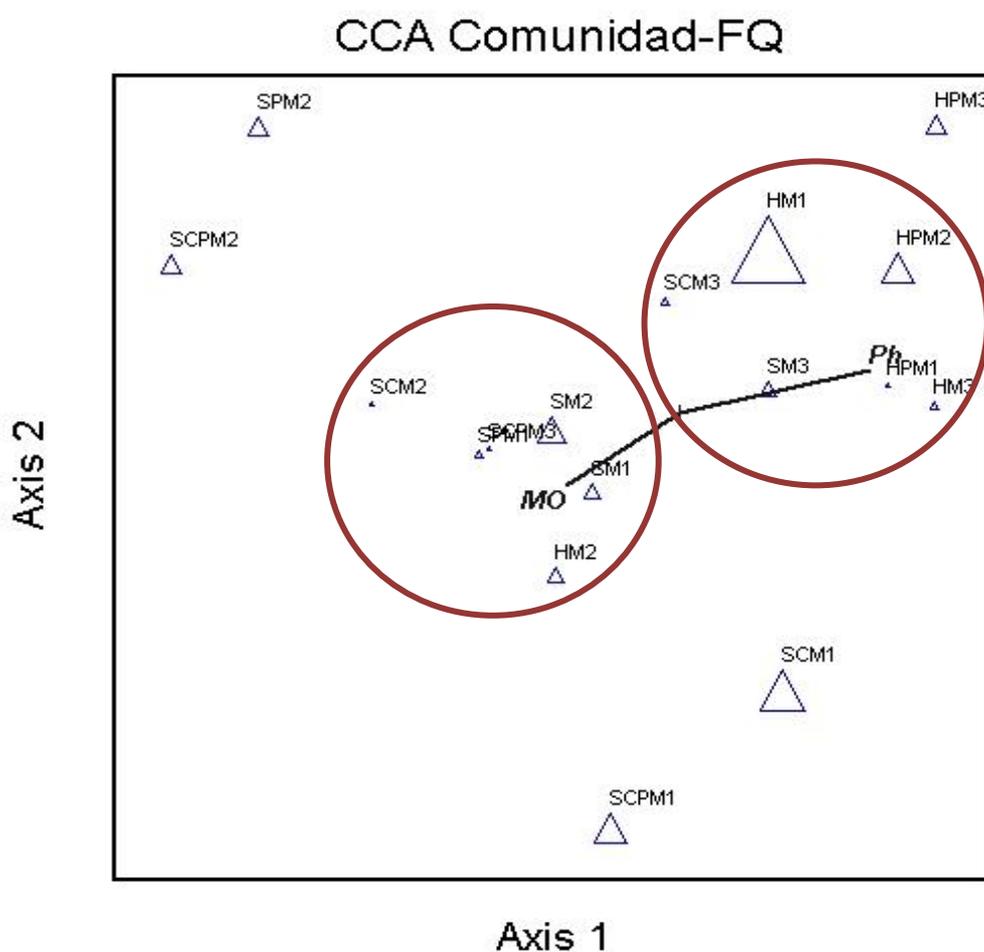


Figura 12. Análisis de Correlación Canónica entre los análisis físico-químicos del suelo y la comunidad de bacterias cultivables.



BIOMASA TOTAL DE LAS PLANTAS

Sobrevivencia de plantas

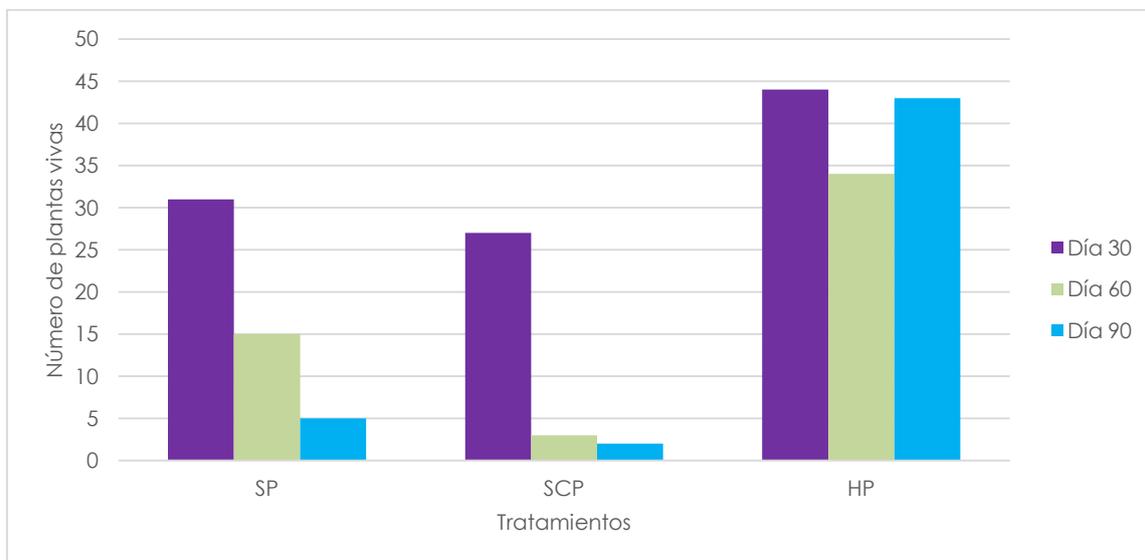


Figura 13. Número de plantas que sobrevivieron en los tratamientos de suelo con planta (SP), suelo con combustóleo y planta (SCP) y hexano con planta (HP) a lo largo del experimento. Los números son la sumatoria de las plantas en las tres repeticiones de cada tratamiento (n=3).

El total de semillas sembradas por tratamiento por muestreo es de 60. El número de plantas vivas disminuye en el suelo con planta (SP) y el suelo con combustóleo y con planta (SCP) a través del tiempo (Figura 13).



Determinación de biomasa vegetal

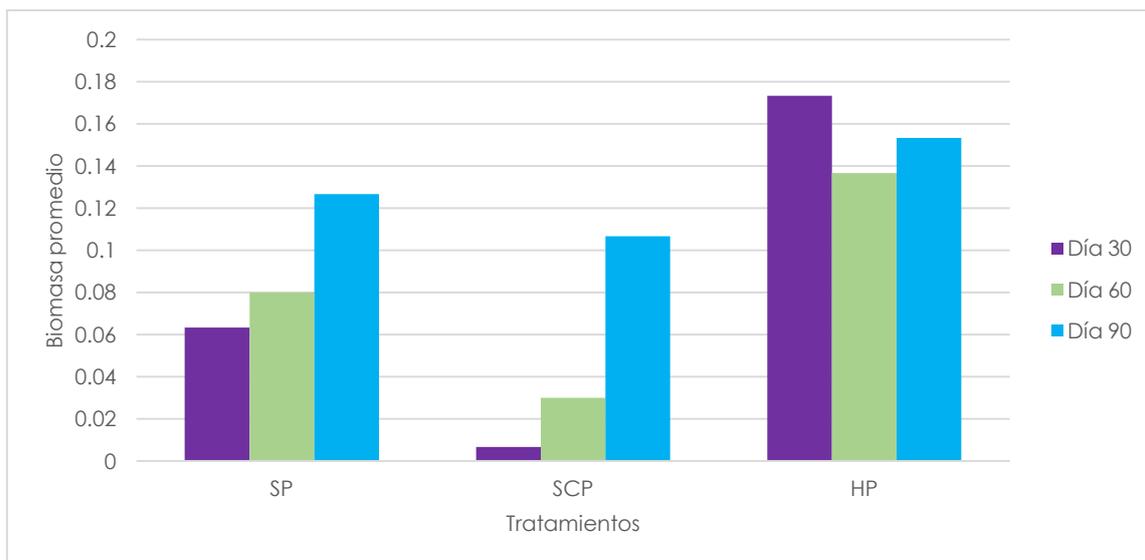


Figura 14. Biomasa de las plantas (g en peso seco) en los tratamientos de suelo con planta (SP), suelo con combustóleo y planta (SCP) y suelo con hexano y planta (HP). (n=3)

El promedio de la biomasa vegetal aumentó con el tiempo en los tratamientos de suelo (SP) y suelo con combustóleo (SCP). Y la mayor biomasa promedio se encontró en el tratamiento de suelo con hexano (HP) a lo largo de todo el experimento (Figura 14).



DISCUSIÓN

El nitrato y amonio son las formas del nitrógeno mejor asimiladas por las plantas y por los microorganismos (Deni *et al.* 1999, Rivera-Espinoza *et al.* 2003); por ello, las concentraciones de nitratos en los diferentes tratamientos mostraron una tendencia decreciente. Lo anterior también explica que las mayores diferencias en el contenido de nitratos se observaran entre los tratamientos con planta y sin planta independientemente de la presencia del hidrocarburo (Figura 2). La concentración de nitratos en el suelo con planta (SP) y en el suelo con combustóleo y planta (SCP) del presente estudio es menor incluso que la obtenida en suelo contaminado con hidrocarburos y sembrado con maíz (Rivera-Espinoza *et al.* 2003). Lo anterior se debe a que la dinámica de absorción del nitrato es diferente entre la gramínea y la leguminosa, pues con el maíz se reportó una disminución seguida de un aumento en la concentración de los nitratos mientras que en la leguminosa sólo se observó la disminución de los mismos (Figura 2).

Cabe resaltar que la concentración de nitratos en el suelo de origen o sin contaminar (S) es mayor a lo reportado en otros trabajos (Banerjee *et al.* 1992, Rivera-Cruz *et al.* 2006, Ming *et al.* 2011, Ñustez-Cuartos 2012), pero coincide con la concentración reportada en otro suelo de cultivo de maíz del Estado de México (Rivera-Espinoza *et al.* 2003).

La concentración de amonio y nitrato cuantificado en este trabajo (Figura 2 y 4) en el suelo con combustóleo (SC) coincide con lo que encontraron Rivera-Espinoza *et al.* (2003).

La concentración de amonio del suelo con planta (SP) y suelo con hexano y planta (HP) varía de manera similar a la del suelo (S); primero hay una disminución del día 30 al 60 debido al crecimiento de los microorganismos activos que aprovechan el amonio disponible (Blagodatskaya *et al.* 2013) y al día 90 hay un incremento en la concentración debido al aporte que generan los microorganismos como las mismas bacterias, protozoos o nemátodos como parte de su metabolismo (Gobat *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 1992; Rivera-Espinoza *et al.*, 2003; Rivera-Cruz *et al.*, 2006; Ming *et al.*, 2011; Ñustez-Cuartos, 2012). Esto coincide con el aumento seguido de la disminución de la abundancia de bacterias en éstos tratamientos. Por otro lado, la concentración de amonio aumentó en el suelo con combustóleo y planta (SCP) durante el periodo de estudio, lo que está relacionado con la alta sensibilidad de los nitrificadores a la presencia de compuestos



orgánicos en el ambiente, y finalmente, a la inhibición de la monooxigenasa (Deni *et al.* 1999). Además, el combustóleo retrasa el crecimiento y metabolismo de las bacterias (Leahy *et al.* 1990; Nie *et al.* 2011; Sutton *et al.* 2013), disminuyendo la cantidad de amonio que pueden consumir.

Se obtuvo una cantidad de entre 10^5 y 10^6 bacterias por g de suelo seco en todos los tratamientos (Figura 5), esto es menor a lo reportado por Kim *et al.* (2006), Del-Panno *et al.* (2005) y Rivera-Cruz *et al.* (2006) en suelos contaminados con Benzo (a) pireno (Bap) y diésel. En estos estudios se obtuvieron poblaciones bacterianas entre 10^7 y 10^9 por g suelo seco.

La cantidad de UFC fue similar en el día 30 entre el suelo con combustóleo y planta (SCP) y el suelo control con planta (SP). Sin embargo, el suelo con combustóleo y planta (SCP) a los 60 días registró una mayor cantidad de UFC en contraste con el suelo del tratamiento sin contaminar (SP) (Figura 5). Esto coincide con el estudio realizado por Kim *et al.* (2006) en el que la cantidad de UFC fueron mayores en el suelo rizosférico contaminado con diesel en comparación con un suelo rizosférico no contaminado ya que el combustóleo representa una fuente adicional de carbono que ciertos microorganismos pueden aprovechar. Esto, aunado al carbono exudado por la raíz de la planta, proporciona una mayor diversidad de fuentes de alimento (Gobat *et al.* 2004). Kim *et al.* (2006) observaron que las poblaciones bacterianas fueron mayores en el suelo con planta que en el suelo desnudo.

Sin embargo, los factores externos como la contaminación con combustóleo y hexano, y el establecimiento de la planta no produjeron un cambio estadísticamente significativo en la cantidad de bacterias (Figura 5), lo que sugiere que el proceso de recuperación de la comunidad bacteriana del suelo se lleva a cabo en poco tiempo.

La riqueza de UTOs fue mayor en el suelo con combustóleo y planta (SCP) que en el suelo con planta (SP), al igual que la riqueza de UTOs fue menor en el suelo desnudo(S) que en el suelo con combustóleo (SC) ya que el combustóleo funcionó como una fuente adicional de carbono y no disminuyó la riqueza de UTOs (Figura 6). La diversidad de exudados proporcionados por las raíces de las plantas atrae una mayor variedad de tipos bacterianos (UTOs) aún en los suelos contaminados con hidrocarburos. Por lo que, en el caso de la contaminación con combustóleo, la planta fue un factor que brindó soporte a las



poblaciones de diferentes UTOs microbianas, brindándoles un refugio del impacto del combustóleo. A cambio, estas poblaciones microbianas pueden funcionar como un mecanismo de defensa para la planta contra agentes tóxicos (Walton *et al.* 1994).

El suelo con combustóleo (SC) tuvo la mayor cantidad de UTOs dominantes a los 30 días (Figura 7b) acompañadas de muchas UTOs raras. Esta estructuración corresponde al impacto de un pulso fuerte de contaminación sobre la comunidad de microorganismos. Este impacto produce que la mayoría de las especies comunes y dominantes de un ecosistema se transformen en raras. Sin embargo, las especies raras juegan un papel importante en el ecosistema como reguladores de situaciones ambientales particulares (Lyons *et al.* 2005).

El tipo de contaminante también determina la respuesta de la comunidad, pues el hexano generó la mayor selectividad en el suelo con planta (HP). En estos microcosmos, la UTO-93 fue la cepa con la mayor abundancia durante todo el experimento (Figura 7f, 8f y 9e). Esta misma UTO-93 fue común en el suelo con hexano (H) y suelo con combustóleo y planta (SCP) en el periodo de 30 días (Figura 7d y 7e) y en el día 90 es común en todos los tratamientos. Aunque el hexano es muy volátil y la mayor parte se pierde inmediatamente después de aplicarlo y mover el suelo, se puede quedar adsorbida un poco cantidad en el suelo y ser usada como fuente de carbono por algunas bacterias (Álvarez-Bernal *et al.* 2006). El hexano es letal para algunas UTOs, por lo que las tolerantes pueden usar la biomasa de los microorganismos muertos como fuente de carbono (Álvarez-Bernal *et al.* 2006).

El suelo con combustóleo y planta (SCP) fue el tratamiento con más UTOs comunes (4-6 UTOs) en el día 30, lo que puede indicar que hay una mayor diversidad de recursos que pueden estar aprovechando diferentes microorganismos debido al combustóleo y a los compuestos orgánicos secretados por las raíces de la planta (Buée *et al.*, 2009) (Figura 7d).

El tratamiento de suelo desnudo (S) fue el único que mantuvo una distribución similar de los recursos a lo largo de los 3 muestreos sin UTOs dominantes, sólo comunes y raras (Figura 7a, 8a y 9a). Esto se esperaba debido a que fue el único tratamiento sin influencia de contaminantes (combustóleo o hexano) ni planta que modificaran la estructura de la comunidad. Por otro lado, el suelo con planta (SP) fue el único que



mantuvo una curva hiperbólica durante el experimento, lo cual nos dice que sólo unas pocas UTOs aprovecharon mucho recurso (dominantes).

El suelo con combustóleo (SC) tuvo 3 UTOs dominantes, 11 comunes y 17 raras en el primer muestreo (Figura 7b). Se puede establecer que la respuesta de la comunidad al primer contacto con el combustóleo favoreció a pocas UTOs tolerantes, ya sea aprovechando la presencia del contaminante como fuente de carbono, o ingiriendo la biomasa disponible de los organismos que no toleraron éste contaminante. En el segundo muestreo se observaron 4 UTOs raras, 1 dominante y las demás comunes (Figura 8b), lo que nos habla del inicio de la recuperación de la comunidad después del pulso de contaminación. En el tercer muestreo se presentaron UTOs comunes y raras lo que indica que el proceso de recuperación sigue avanzando (Figura 9b).

Contrario a lo anterior, el suelo con hexano (H) pasó de 2 UTOs dominantes, 3 raras y muchas comunes en el primer muestreo a sólo comunes y raras en el segundo y tercer muestreo. La comunidad bacteriana tardó más en recuperarse del efecto de la contaminación con hexano que de la del combustóleo.

El suelo con combustóleo y planta (SCP) presentó una repartición equitativa de los recursos en el día 30 con sólo una UTO dominante y las demás comunes raras. En el día 60 sólo se encuentran 23 UTOs comunes y 13 raras y regresa a una UTO dominante con sólo 7 raras y 25 comunes a los 90 días (Figura 7, 8 y 9).

Al hacer el análisis de Similitud de Sørensen (Figura 10), se puede observar que al día 60 se obtienen comunidades diferentes, las que se presentan el suelo con planta (SP), suelo con combustóleo y planta (SCP) y el suelo con hexano (H) quedan separados de los demás tratamientos compartiendo menos del 50 % de información con los otros grupos. Estas comunidades aún no se recuperaban ya que todos los tratamientos son diferentes del suelo control, tomando en cuenta todos los factores como los contaminantes y la planta. Sin embargo, a los 90 días se formó un encadenamiento de los tratamientos del suelo (S), suelo con combustóleo (SC) del día 60 y 90, suelo con combustóleo y planta (SCP) del día 90 y el suelo con hexano (H) del día 30 y 90 (Figura 2). Este encadenamiento del dendrograma muestra que las comunidades del suelo se recuperaron considerablemente. Lo anterior coincide con Del-Panno *et al.* (2005), quienes observaron que los



microcosmos contaminados y los microcosmos de suelo desnudo forman una agrupación al final de su experimento.

El suelo con hexano y planta formó una comunidad completamente diferente a los demás tratamientos (Figura 10). Algunas bacterias son seleccionadas de manera fuerte y rápida por el hexano, por lo que la comunidad se reconfigura cuando es estimulada por la adición de nutrientes (Chikere *et al.* 2009) como los exudados de las raíces de las plantas.

En este estudio se encontró una mayor cantidad de bacterias gram (+), principalmente cocos (Figura 11), lo que concuerda con algunos estudios de contaminación del suelo con hidrocarburos (Quatrini *et al.* 2008, Chikere *et al.* 2009). Aunque la mayoría de los estudios en sitios contaminados con petróleo están dominados por bacterias gram (-) (Rivera-Cruz *et al.* 2002, Leahy *et al.* 1990, Sutton *et al.* 2013, Del-Panno 2005).

Las bacterias gram (+) están adaptadas a condiciones de recursos limitados y no fluctúan en respuesta al incremento de una fuente de C como los hidrocarburos (Quatrini *et al.* 2008). Deneff *et al.* (2009) observaron que las bacterias gram (+) asimilaban el C proveniente de la raíz de trigo de manera más activa que las bacterias gram (-).

En el suelo con combustóleo (SC) del primer muestreo hubo una misma cantidad de bacterias gram (+) y gram (-), pero en el segundo y tercer muestreo hay diferencias, la cantidad de bacterias gram (+) es el doble que las gram (-) (Figura 11).

Al realizar el análisis de correlación canónica de los parámetros físico-químicos y la comunidad bacteriana mostró que el pH es uno de los factores que modifican esta comunidad (Figura 12). O'Donnell *et al.* (2001) observaron que el cambio en la comunidad microbiana puede deberse al efecto residual de la materia orgánica y no a la diferencia del uso de los nutrientes por parte de las comunidades microbianas, sugiriendo que el pH es más importante que los nutrientes en la estructuración de la comunidad. Por otra parte, Sutton *et al.* (2013), realizaron análisis multivariados para determinar el impacto de los parámetros ambientales con la estructura de la comunidad encontrando que el pH contribuye significativamente a explicar la variación observada en la composición de la comunidad bacteriana.



En éste trabajo se vio afectado el establecimiento de las plantas a lo largo del tiempo ya que hubo un decremento en el número de plantas vivas a los 60 y 90 días (Figura 13), pero la biomasa de las mismas incrementó en el día 90 en los tres tratamientos (Figura 14). Smith *et al.* (2006) reportaron que, mientras que las plantas (gramíneas y leguminosas) fueron capaces de germinar y establecerse en un suelo contaminado con una mezcla de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs por sus siglas en inglés), el crecimiento subsecuente se vio reducido significativamente debido a la fitotoxicidad de estos volátiles combinados con las condiciones experimentales empleadas.

El conocimiento de la funcionalidad de las poblaciones microbianas puede ser usado para el proceso de eliminación de los contaminantes en el ecosistema. Finalmente, el incremento de las regulaciones de remediación ha producido un aumento de los proyectos de atenuación natural al riesgo que representan los contaminantes. Pero se necesita un entendimiento de las poblaciones microbianas presentes en los suelos contaminados para diseñar estrategias de remediación.

CONCLUSIÓN

La alfalfa favoreció el establecimiento de la comunidad de bacterias tolerantes no sólo al combustóleo, sino que también ayudó a las bacterias tolerantes al hexano.

La presencia de *M. sativa* cambió completamente la comunidad de bacterias en el suelo con hexano (HP) formando un grupo separado del resto de los tratamientos. Éste efecto no se vio en el suelo con hexano sin la planta (H) ya que la mayor similitud fue con el suelo con combustóleo y planta (SCP) en el día 60 y 90.

Se logró determinar la abundancia bacteriana por diluciones seriales y la riqueza en los tratamientos a partir de las UTOs obtenidas de los cultivos axénicos.

Estas interacciones que se desarrollan entre planta-microorganismo pueden utilizarse para acelerar la remediación de los suelos contaminados.



REFERENCIAS

Allen J.P., Atekwana E.A., Duris J.W., Werkema D.D., Rossbach S., (2007) The microbial community structure in petroleum contaminated sediments corresponds to geophysical signatures, *Applied Environmental Microbiology* 73: 2860-2870.

Álvarez-Bernal D., García-Díaz E.L., Contreras-Ramos S.M., Dendooven L., (2006) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost, *Chemosphere* 65: 1642-1651.

Atlas M.R., Horowitz M., Krichevky K.A., (1991) Response of microbial population to environmental disturbance, *Microbial Ecology* 22: 249-256.

Banerjee M.R., Dey B.K., (1992) Effects of different pesticides on microbial populations, nitrogen mineralization, and thiosulphate oxidation in the rhizosphere of jute (*Corchorus capsularis* L. cv.), *Biology and Fertility of Soils* 14:213-218.

Barrera-Escorcia E., Canales-Martínez M.M., Camarena-Gutiérrez G., Castillo-Padilla I.R., Fregoso-Padilla M.M.L., García-Bores A.M., González-Pantaleón D., Hernández-Delgado C.T., Martínez-Aguilar J., Muñoz-Torres A., Palomar-Morales M., Segura-Alegría B., Vilches-Flores A.A., (2007) *Métodos de laboratorio Vol. III Microbiología, Biomoléculas, Técnicas Diversas*, UNAM-FES Iztacala.

Beyers R.J., Odun H.T., (1993) *Ecological Microcosms*, Ed. Springer-Verlag, NY.

Blagodatskaya E., Kuzyakov Y., (2013) Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches, *Soil Biology and Biochemistry* 67: 192-211.

Buée M., De-Boer W., Martin F., Van-Overbeek L., Jurkevitch E., (2009) An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and some of their structuring factors, *Plant Soil* 321: 189-212.

Chikere C.B., Okpokwasili G.C., Ichiakor O., (2009) Characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in tropical marine sediments, *African Journal of Biotechnology* 8(11): 2541-2544.

CICEANA-Centro de Información y Comunicación Ambiental de Norte América A.C., *Ciclo del Nitrógeno*.



Cortés-Pérez S., (2009) Cambio de la comunidad de amebas desnudas en suelo contaminado por combustóleo en el Municipio de Jalacingo, Ver., Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Programa de Posgrado.

Cortés-Pérez S., Rodríguez-Zaragoza S., Mendoza-López M.R., (2014) Trophic Structure of Amoeba Communities Near Roots of *Medicago sativa* After Contamination with Fuel Oil No. 6, *Microbial Ecology* 67: 430–442.

Del-Panno M.T., Morelli I.S., Engelen B., Berthe-Corti L., (2005) Effect of petrochemical sludge concentration on microbial communities during soil bioremediation, *Microbiology Ecology* 53: 305-316.

Deni J., Penninckx M.J., (1999) Nitrification and Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Hydrocarbon-Polluted Soil, *Applied and Environmental Microbiology* 65(9): 4008-4013.

Denef K., Roobroeck D., Manimel-Wadu M.C.W., Lootens P., Boecky P., (2009) Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils, *Soil Biology and Biochemistry* 41: 144-153.

Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Mendoza-López M.R., Sangabriel W., Trejo-Aguilar D., Cruz-Sánchez J.S., López-Ortiz C., Delgadillo –Martínez J., (2007) Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica, *Agrociencia* 41: 817-826.

Finlay B.J., Maberly S.C., Cooper J.I., (1997) Microbial diversity and ecosystem function, *Oikos* 80: 209-213.

Girvan M., Campbell C., Killham K., Prosser J., Glover L., (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation, *Environmental Microbiology* 7(3): 301-313.

Gobat J.M., Aragno M., Matthey W., (2004) *The Living Soil-Fundamentals of Soil Science and Soil Biology*, Science Publishers Inc., NH, USA.

Janssen P.H., (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA genes, *Applied Environmental Microbiology* 72: 1719-1728.

Joner E., Leyval C., (2003) Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of



arbuscular mycorrhiza, *Environmental Science and Technology* 37: 2371-2375.

Kassem A., Paolo N., (1995) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Academic Press pp 79-87.

Kim J., Kang S.H., Min K.A., Cho K.S., Lee I.S., (2006) Rhizosphere microbial activity during phytoremediation of diesel-contaminated soil, *Journal of Environmental Science and Health* 41: 2503-2516.

Labud V., García C., Hernández T., (2007) Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and clay soil, *Chemosphere* 66: 1863-1871.

Leahy J.G., Colwell R.R., (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological reviews* 54: 305-315.

Lyons K.G., Brigham C.A., Traut B.H., Schwartz M.W., (2005) Rare Species and Ecosystem Functioning, *Conservation Biology* 19(4): 1019-1024.

Margesin R., Schinner F., Zaos T., (2005) *Manual of soil analysis monitoring and assessing soil bioremediation*, Springer pp 366.

Miles A.A, Misra S.S, Irwin J.O., (1938) The estimation of the bactericidal power of the blood, *Journal of Hygiene* (38): 732-749.

Ming N., Wang Y., Yu J., Xiao M., Jiang L., Yang J., Fang Ch., Chen J., Li B., (2001) Understanding Plant-Microbe Interactions for Phytoremediation of Petroleum-Polluted Soil, *Plos ONE* 6(3): 1-8.

Mondragón-Camarillo L., (2011) Estructura trófica de la comunidad de ciliados y flagelados en un suelo de cultivo contaminado con combustóleo de Jalacingo, Veracruz, Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Programa de Posgrado.

Muñoz-Iniestra D.J., Mendoza-Cantú A., López-Galindo F., Soler-Aburto A., Hernández-Moreno M.M., (2012) Edafología, *Manual de métodos de análisis del suelo*, UNAM FES Iztacala pp. 41-45.

Néble S., Calvert V., Le-Petite J., Criquet S.M, (2007) Dynamics of phosphatase activities in a cork oak litter (*Quercus suber* L.) following sewage sludge application, *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2735-2742.



Nerad T.A., Daggett P.M., (1992) Cultivation of Photosynthetic Dinoflagellates, *Protocolos en Protozoología*, Sociedad de Protozoólogos, Allen Press Inc., Kansas pp A-8.1.

Nichols T.D., Wolf D.C., Rogers H.B., Beyrouthy C.A., Reynolds C.M., (1997) Rhizosphere microbial populations in contaminated soils, *Water Air Soil Pollution* 95: 165-178.

Nie M., Wang Y., Yu J., Xiao M., Jiang L., Yang J., Fang C., Chen J., Li B., (2011) Understanding Plan-Microbe Interactions for Phytoremediation of Petroleum-Polluted Soil, *Plos One* 6(3): 1-8.

Ñustez-Cuartas D.C., (2012) Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible, Tesis de Maestría, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales Pereira, Colombia.

O'Donell A.G., Seasman M., Macrae A., Waite I., Davies J.T., (2001) Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils, *Plant and soil* 232: 135-145.

Ortíz O., Lema I., Gavilán A., (2003) La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México, *Gaceta ecológica* 69: 83-92.

Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R., (1997) Biological indicators of soil health: synthesis, CAB International, Wallingford pp 419-435.

Pilon-Smits E., (2005) Phytoremediation, *Annual review of plant physiology* 56: 15-39.

Podani J., (1994) *Multivariate data analysis in ecology and systematics*, SPB Academic Publishing, Ecological Computational Series (ECS) vol. 6.

Porta C., López-Acevedo L., Roquero C., (1999) *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*, Ed. Mundi Prensa, Madrid, España.

PROFEPA. 2010. Reporte de emergencias ambientales en México 2005. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). México. Consultada en junio, 2010. <http://www.profepa.gob.mx/PROFEPA/EmergenciasAmbientales/AnalisisNacionaldeEmergenciasAmbientales/>

<http://oc4jver.veracruz.gob.mx/Municipios/municipio?ciudad=30086&seccion=economicaXXV>



Quatrini P., Scaglione G., De Pacuale C., Riela S., Puglia A.M., (2008) Isolation of Gram-positive *n*-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline, *Journal of Applied Microbiology* 104: 251-259.

Rivera-Cruz M.C., Ferrera-Cerrato R., Volke-Haller V., Rodríguez-Vázquez R., Fernández-Linares L., (2002) Adaptación y selección de Microorganismos Autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo, *Terra* 20:423-434.

Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Ferrera-Cerrato R., Rodríguez-Vázquez R., Volke-Haller V., Sánchez-García P., Fernández-Linares L., (2006) Fitorremediación de suelos con Benzo (a) pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc, *Universidad y Ciencia* 22(1): 1-12

Rivera-Espinoza Y., Dendooven L., (2003) Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize, *Chemosphere* 54: 379–386.

Rodríguez-Zaragoza S., (2005) Protozoos del suelo. En: *Microbiología Agrícola hacia el siglo XXI*, Editado por Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México pp 249-256.

Said B.O., Goni-Urrizaa M.S., El-Bour m., Dellali M., Aissa P., Duran R., (2008) Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia, *Journal of Applied Microbiology* 107: 987-997.

Sanchez-Peinado M.M., Rodelas B., Martínez-Toledo M.V., González-López J., Pozo C., (2009) Response of soil enzymes to Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) addition in soil microcosms, *Soil Biology and Biochemistry* 41: 69-76.

Sangabriel W., Ferrera-Cerrato R., Trejo D., Mendoza M., Cruz S., López C., Delgadillo J., Alarcón A., (2006) Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22(002): 63-73.

Sarmiento M., Ortíz E., Álvarez J., (2003) Emergencias ambientales asociadas a sustancias químicas en México, *Gaceta ecológica* 66: 54-63.



Smith M.J., Flowers T.H., Duncan H.J., Alder J., (2006) Effects of polycyclic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues, *Environmental Pollution* 141: 519-525.

Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Al-Soud W.A., Langenhoff A.A.M., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H.M., Smidt H., (2013) Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure, *Applied and Environmental Microbiology* 79(2): 619-630.

Swift M.J., (1994) *Maintaining the biological status of soil: a key to sustainable land management*, CAB International, Wallingford pp 235–247.

Tang J., Niu X., Sun Q., Wang R., (2010) Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms, *Journal of Environmental Technology and Engineering* 3(2): 80-86.

Walton B.T., Hoyleman A.M., Perez M.M., Anderson T.A., Johnson T.R., Guthrie E.A., Christman R.F., (1994) Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils, *Bioremediation through rhizosphere technology*, American Chemical Society, Washington DC pp 82-92.

Wiltse C.C., Rooney W.L., Chen Z., Schwab A.P., Banks M.K., (1998) Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes, *Journal of Environmental Quality* 27: 169-173.

Wolters V., Schaefer M., (1994) Effects of acid deposition on soil organisms and decomposition processes. Eds. A. Hutterman, and D. Godbold. Wiley, New York pp 83–127.

Xiaoyun C., Manqiang L., Feng H., Xiaofang M., Huixin L., (2007) Contributions of soil micro-fauna (protozoa and nematodes) to rhizosphere ecological functions, *Acta Ecologica Sinica* 27(8): 3132-3143.



ANEXO 1

MEDICIÓN DE pH (Muñoz-Iniestra *et al.* 2012)

Materiales

1. Muestra de suelo seco y cernido a través de un tamiz de malla no.10
2. Frascos de 50ml
3. Agitador
4. Agua destilada y buffers

Métodos

1. Pesar 10g de suelo.
2. Colocarlo en el frasco de 50ml
3. Agregar 25ml de agua destilada.
4. Agitar 30min y dejar reposar 30min.
5. Ajustar el potenciómetro con la solución buffer
6. Leer en el potenciómetro el pH

Notas

CATEGORÍA	VALOR
Extremadamente ácido	menor 4.5
Muy fuertemente ácido	4.6-5.1
Fuertemente ácido	5.2-5.6
Moderadamente ácido	5.7-6.1
Ligeramente ácido	6.2-6.6
Neutro	6.7-7.4
Ligeramente alcalino	7.5-7.9
Moderadamente alcalino	8-8.4
Fuertemente alcalino	8.5-8.9
Muy fuertemente alcalino	mayor 9.1

CUANTIFICACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA (Muñoz-Iniestra *et al.* 2012)

Materiales

1. Muestra del suelo seco y cernido a través de un tamiz de malla no. 10



2. Solución de dicromato de potasio 1N. Pesar exactamente 49.04g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), disolver en agua destilada y aforar a 1 litro.
3. Solución de sulfato ferroso 0.5N. Pesar 139g de sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) y disolver en 500ml de agua destilada, agregar 45ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), enfriar y aforar a 1 litro.
4. Solución indicadora de difenilamina. Pesar 0.5g de difenilamina y disolver en 20ml de agua destilada y 100ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

Métodos

1. Retamizar el suelo con malla no. 60 y pesar 0.5g, si es muy oscuro o la presencia de materia orgánica es muy evidente, pesar 0.2g.
2. Colocarlo en un matraz Erlenmeyer.
3. Agregar con una probeta 5ml de solución de dicromato de potasio.
4. Medir con una probeta de 10ml de ácido sulfúrico y agregarlo al matraz con mucho cuidado, resbalándolo por las paredes.
5. Agitar 1 minuto y dejar reposar durante 30 más.
6. Agregar 100ml de agua destilada.
7. Agregar 5ml de ácido fosfórico.
8. Agregar 3 gotas del indicador de difenilamina.
9. Titular con sulfato ferroso. Durante la titulación la secuencia de cambios de color al bire final es la siguiente: negro, verde muy oscuro, azul y finalmente verde esmeralda.
10. Realizar un blanco para verificar la normalidad del sulfato ferroso, siguiendo los pasos 3 a 9.

Interpretación de método

$$\text{Materia Orgánica(\%)} = \frac{5 - (\text{ml de } FeSO_4 \times N \times F.C.) \times 0.69}{\text{g de muestra}}$$

Donde: 5=ml de dicromato de potasio agregados

N=normalidad del sulfato ferroso

F.C.= factor de corrección

0.69= constante

El factor de corrección se obtiene de la siguiente manera:

$$F.C. = \frac{10}{\text{ml de } FeSO_4 \text{ gastados en el blanco}}$$



Notas

CATEGORÍA	VALOR (%)
Extremadamente pobre	menor 0.6
Pobre	0.6-1.2
Moderadamente pobre	1.3-1.8
Medio	1.9-2.4
Moderadamente rico	2.5-5
Rico	5.1-14
Extremadamente rico	mayor 14

EXTRACCIÓN DE NITRÓGENO MINERAL (Alef *et al.* 1995)

Materiales

1. Cloruro de Potasio 2M.
2. Disolver 149.12 g KCl en 600 ml de agua destilada y aforar a 1000ml con agua destilada, mezclar bien.

Métodos

1. Pesar suelo seco equivalente a 10 g de peso seco en un envase de 250 ml de polietileno y agregar 100 ml de la solución de cloruro de potasio 2M. Agitar durante 1h a 120 rpm y filtrar la suspensión de suelo en otro frasco de 100-250 ml de polietileno.

Interpretación de método

Las mediciones se deben realizar inmediatamente; como alternativa, el filtrado se debe almacenar a una temperatura menor de -18 °C

Notas

Se usaron 30 g de suelo (peso seco) en lugar de 10 g para poder obtener una mayor concentración de nitrógeno y que se pudiera detectar por la técnica utilizada.



CUANTIFICACIÓN DE NITRATO (Alef *et al.* 1995)

Materiales

1. HIDRÓXIDO DE SODIO 4M. Disolver 160 g de NaOH en 600 ml de agua destilada; aforar y agitar bien.
2. ÁCIDO SALICÍLICO 5 %. Disolver 5 g de ácido salicílico en 95 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-97 %)
3. SOLUCIÓN STOCK 1000 mg Na₃-N l⁻¹. Disolver 1.8 g de nitrato de potasio en 650 ml de agua destilada y aforar a 1000 ml.
4. SOLUCIÓN DE TRABAJO. Pipetear 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de la solución stock en frascos de 100 µl y aforar para tener un volumen de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg NO₃-N l⁻¹.

Métodos

Pipetear 500 µl de cada solución de trabajo y de las muestras en un tubo de ensayo. Agregar 1 ml de la solución de ácido salicílico, mezclar bien y dejar reposar por 30 min. Agregar 10ml de NaOH 4M y dejar reposar por 1 h para que se desarrolle el color. Leer la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro.

Trazar una curva patrón de la medida de las absorbancias contra la concentración. Determinar las concentraciones del blanco y de las muestras.

Interpretación de método

Después de la corrección de las lecturas, la concentración original en el suelo es calculada por

$$\text{NO}_3\text{-N}(\text{mg kg}^{-1}) = \frac{C \cdot V}{W}$$

Donde C es la concentración de NO₃-N corregida en las muestras, V es el volumen final de la solución y W es el equivalente al peso seco del suelo. Para lo anterior si se usó el método de extracción de KCl 2M, la concentración de NO₃-N en el suelo es igual C*10.

Notas

En el caso de extractos de suelo con color, se debe realizar un blanco adicional en el que se tiene que agregar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado sin el ácido salicílico.



CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS (Alef *et al.* 1995)

Materiales

1. SOLUCIÓN SULFANILAMIDA. Disolver 0.5 g de sulfanilamida en 100 ml de HCl_{2.4M} y almacenar a 4 °C (solución diazoting)
2. SOLUCIÓN (N-(1-naftil)-etilendiamina)-hidroclorido. Disolver 0.3 g de (N-(1-naftil)-etilendiamina)-hidroclorido en 100 ml de HCL 0.12M y almacenar en frasco ámbar a 4 °C (agente de unión).
3. SOLUCIÓN STOCK DE NITRITO (1000 mg NO₃-N1-1). Disolver 4.925 g de nitrito de sodio en 600 ml de agua, aforar a 1000 ml y mezclar bien. Esta solución es estable por 6 meses si se conserva en refrigeración.
4. SOLUCIÓN INTERMEDIA DE NITRITO (10 mg NO₃-N1-1). Diluir 10 ml de la solución stock en 1000 ml de agua destilada y mezclar bien.
5. SOLUCIÓN DE TRABAJO DE NITRITO. Pipietear 0, 50, 100, 200, 400 y 600 µl en frascos de 50 ml y diluir en 45 ml de agua destilada.

Métodos

Diluir 2 ml de extracto de suelo en 45 ml de agua destilada en un frasco de 50 ml. Agregar 1 ml de la solución de sulfanilamida, mezclar bien y dejar reposar 5 min. Agregar 1 ml del agente de unión, mezclar bien y dejar que el color se desarrolle por 20 min. Aforar a 50 ml con agua destilada, mezclar bien y leer la absorbancia a 540 nm. Trabajar con la solución de trabajo de la misma manera.

Trazar una curva de calibración de las absorbancias estándar contra las concentraciones, leer las concentraciones de las muestras de la trama o calcularlas con la ecuación de regresión de primer orden.

Interpretación de método

La concentración de nitrato del suelo se da por la siguiente ecuación

$$C_e = \frac{C_a * f_e * V_e}{W}$$

Donde C_a es la concentración aparente del extracto tomado de la curva de calibración, V_e es el volumen total del extracto de suelo, W es el peso del suelo seco usado, y f_e es el factor de dilución de la solución de medición, que es 25 si se usaron 2 ml del extracto y 50 ml de volumen final.



Notas

La concentración de nitrito en los extractos permanece estable por varias semanas a 4 °C (Keeney y Nelson, 1982). La mayoría de los cationes y aniones, y la materia orgánica extraída no interfieren con la determinación colorimétrica, mientras que Hg_2^+ y Cu_2^+ lleva a resultados más altos o bajos, respectivamente, debido a la descomposición de la sal de diazonio en el último caso. Cada serie de análisis debe incluir un control para la corrección de las soluciones de color.

CUANTIFICACIÓN DE AMONIO (Alef *et al.* 1995)

Materiales

1. SOLUCIÓN DE COLOR. Disolver 34 g de salicilato de sodio, 25 g de citrato de sodio y 25 g de tartrato de sodio en 750 ml de agua destilada. Añadir 0.12 g de nitroprusiato de sodio, disolver y aforar a 1000 ml.
2. SOLUCIÓN ALCALINA DE HIPOCLORITO. Disolver 30 g de hidróxido de sodio en 750 ml de agua destilada. Añadir 10 ml de hipoclorito de sodio y aforar a 1000 ml.
3. CALIBRACIÓN. Disolver 4.719 g de sulfato de amonio seco en 400 ml de agua destilada y después aforar a 1000 ml (solución stock). Pipetear 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ± 0.0001 ml de la solución stock en frascos de 100 ml para dar los patrones de trabajo de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg NH_4-N . Aforar a 100 ml (solución estándar).

Métodos

1. Transferir una alícuota de 0.1 ml de la muestra o la solución estándar a un tubo de ensayo. Añadir 5 ml de la solución de color, mezclar bien y dejar reposar por 15 min. Agregar 5 ml de la solución alcalina de hipoclorito y mezclar bien. El color se desarrolla en 1 h y permanece estable durante algunas horas. Leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm.
2. Trazar una curva de calibración de las lecturas de la absorbancia contra la concentración estándar, y determinar las concentraciones de muestras y el blanco. Calcular la concentración de las muestras corregidas (C) con la diferencia de la concentración de la muestra menos el blanco.



Interpretación de método

$$\% \text{nitrógeno} = \frac{C \cdot 0.1}{\text{peso de la muestra}}$$

Donde C se mide en miligramos por litro, el peso de la muestra en gramos y se usa un factor de 0.1 para la conversión a porcentaje de nitrógeno.

Notas

Este método es similar al procedimiento original con indofenol azul pero sustituye la tinción de fenol tóxica por el salicilato que es análogo.

CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (Barrera-Escorcia *et al.* 2007)

$$\text{Número de UFC g}^{-1} \text{ de suelo} = \frac{(\text{número de colonias}) \cdot (\text{factor de dilución})}{\text{dilución inicial (ml)}}$$

Medios de Cultivo. Por cada 1000ml

Movilidad bacterias

Glucosa	5 g
Peptona biotriptasa	5 g
Fosfato de potasio	1.5 g
Agar bacteriológico	0.3 g

Agar Extracto de Suelo (Nerad *et al.* 1992)

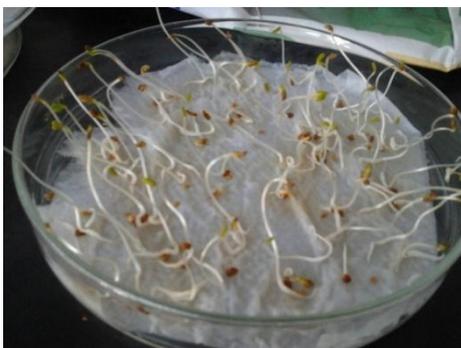
Solución madre	50 ml
Agua destilada	950 ml
Agar bacteriológico	15 g

Medio de cultivo carbón combinado (Rennie 1981)

Solución A		Solución B	
K ₂ HPO ₄	0.8 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g	CaCl ₂	0.06 g
NaCl ₂	0.1g	Agua destilada	100 ml
NaFeEDTA	0.028 g		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025g		
Extracto de levadura	0.1 g		
Manitol	5 g		
Sucrosa	5 g		
Lactato de sodio	0.5 ml		
Agua destilada	900 ml		
Agar bacteriológico	15 g		



ANEXO 2



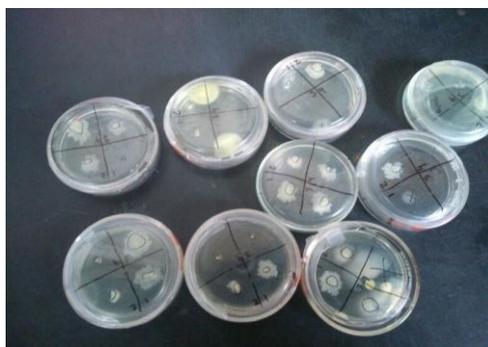
Pruebas de germinación



Raíces en el fondo del bote (SP30)



Suelo adherido a las raíces



Pruebas de movilidad



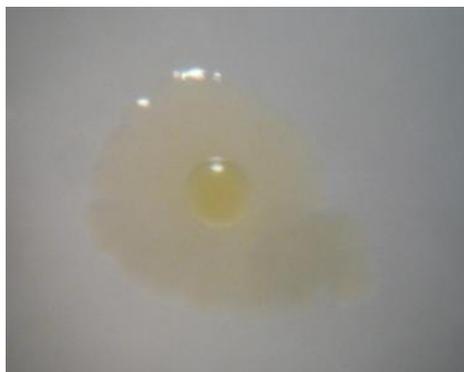
UTO-111



UTO-93



UTO- 112



UTO-37



UTO-38



UTO-40



UTO-



UTO-6



UTO-180



Ejido Orilla del Monte



ANEXO 3

Tabla. Parámetros físico-químicos del suelo.

Tratamientos	pH	% MO	Amonio (mg/L)	Nitrato (mg/kg ⁻¹)	Nitrito (mg/L)
S30	6.63	2.14	25.78	118.89	12777.78
S60	6.64	3.32	17	58.52	8333.33
S90	6.94	2.21	24.89	22.74	5833.33
SC30	6.98	6.34	11.67	112.22	5833.33
SC60	6.77	9.21	11.78	13.93	7222.22
SC90	7.14	8.18	9	24.79	6111.11
SP30	6.51	2.51	22.67	24.44	7222.22
SP60	6.30	2.14	11.33	2.68	10000
SP90	6.77	3.17	41.22	2.17	12500
SCP30	6.86	8.7	17.11	53.33	2777.78
SCP60	6.7	10.25	23.56	4.6	12777.78
SCP90	6.95	8.77	24.78	2.81	7222.22
H30	6.91	2.36	7.22	228.89	18750
H60	6.6	2.43	32.56	31.31	7222.22
H90	7.17	2.36	26	31.82	5000
HP30	7.09	1.77	29.11	142.22	13888.89
HP60	7.04	2.29	0	0	0
HP90	7.35	2.51	29.33	13.16	8333.33



ANEXO 4

Tabla. Riqueza de Unidades Formadoras de Colonias encontrada en los diferentes tratamientos. PD: pigmentos difusibles en agar, PA: producción de agua.

No.	Forma	Elevación	Borde	Color	Forma microscópica	Gram	PD	PA	Movilidad	Rennie	Catalasa
1	Circular	Plana	Entero	Crema	cocos	+	-	-	+	+	+
2	Ameboide	Plana	Entero	Blanco	bacilos	-	-	-	-	+	+
3	Circular	Plana	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
4	Ameboide	Plana	Ondulado	Amarillo	cocos	+	-	-	-	+	+
5	Circular	Plana	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
6	Circular	Plana	Ondulado	Naranja	cocos	+	-	-	+	+	+
7	Circular	Umboada	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
8	Circular	Plana	Entero	Café	bacilos	+	-	-	+	+	+
9	Circular	Plana	Entero	Transparente	cocos	+	-	-	+	+	+
10	Circular	Plana	Entero	Naranja	bacilos	+	-	-	-	+	+
11	Circular	Plana	Crenado	Transparente	cocos	+	-	-	+	+	+
12	Puntiforme	Plana	Filamentoso	Blanco	bacilos	-	-	-	-	-	+
13	Circular	Convexa	Entero	Transparente	cocos	+	-	-	+	-	+
14	Circular	Plana	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
15	Circular	Umboada	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
17	Circular	Plana	Entero	Blanco	bacilos	-	-	-	+	+	+
18	Ameboide	Plana	Ondulado	Amarillo	Bacilos	-	-	-	+	+	+
19	Puntiforme	Plana	Entero	Transparente	cocos	+	-	-	+	+	+
20	Circular	Plana	Filamentoso	Rosa	Bacilos	-	-	-	-	-	+
21	Circular	Plana	Entero	Blanco	Cocos	+	-	-	+	+	+
22	Circular	Plana	Entero	Amarillo	Cocos	+	-	-	+	+	+
23	Ameboide	Plana	Filamentoso	Café	bacilos	-	-	-	-	+	+
24	Puntiforme	Convexa	Entero	Blanco	cocos	-	-	-	-	-	+
26	Puntiforme	Convexa	Entero	Transparente	bacilos	+	-	-	+	+	+
27	Filamentosa	Plana	Filamentoso	Verde	cocos	+	-	-	-	+	+
28	Ameboide	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos	-	-	-	+	+	+
29	Ameboide	Plana	Entero	Crema	Filamentos	-	-	-	+	+	+
30	Ameboide	Plana	Ondulado	Naranja	Bacilos	-	-	-	+	+	+
31	Ameboide	Plana	Ondulado	Tornasol	Bacilos	-	-	-	+	+	+
32	Circular	Cóncava	Filamentoso	Café	Bacilos	-	-	-	+	+	+
33	Circular	Plana	Ondulado	Naranja	Bacilos	+	-	-	+	+	+
34	Circular	Plana	Ondulado	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
35	Puntiforme	Convexa	Ondulado	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
36	Circular	Plana	Crenado	Transparente	Bacilos	+	-	-	-	-	+
37	Ameboide	Convexa	Ondulado	Amarillo	bacilos	-	-	-	+	+	+
38	Circular	Plana	Filamentoso	Café	Cocos	+	-	-	-	-	+
39	Rizoide	Cóncava	Filamentoso	Café	Bacilos	+	-	-	+	+	+



40	Circular	Convexa	Entero	Naranja	Cocos	+	-	-	+	+	+
41	Ameboide	Plana	Ondulado	Blanco	Cocos	+	-	-	+	+	+
42	Ameboide	Plana	Crenado	Naranja	Cocos	+	-	-	-	+	-
43	Ameboide	Plana	Entero	Naranja	Bacilos	-	-	+	+	+	+
44	Circular	Convexa	Entero	Café	Cocos	+	-	+	-	+	+
45	Puntiforme	Plana	Entero	Transparente	Bacilos	-	-	-	-	+	+
46	Puntiforme	Plana	Entero	Naranja	cocos	+	-	+	-	+	-
47	Circular	Plana	Entero	Naranja	Cocos	+	-	-	-	+	+
48	Circular	Convexa	Entero	Transparente	cocos	-	-	-	+	+	+
49	Circular	Plana	Ondulado	Verde	Bacilos	+	-	-	-	+	+
50	Puntiforme	Plana	Ondulado	Café	Bacilos	+	-	-	+	+	+
51	Circular	Elevada	Crenado	Café	cocos	+	-	-	+	+	+
52	Ameboide	Convexa	Ondulado	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
53	Circular	Plana	Crenado	Café	Bacilos	-	-	-	+	+	+
54	Circular	Cóncava	Filamentoso	Blanco	Cocos	+	-	-	+	+	+
55	Circular	Plana	Crenado	Café	Filamentos	-	-	-	+	+	+
56	Puntiforme	Convexa	Entero	Azul	Cocos	+	-	-	-	+	+
57	Ameboide	Plana	Ondulado	Amarillo	Bacilos	-	-	-	+	+	+
58	Circular	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	-	-	-	+	+	+
59	Puntiforme	Plana	Entero	Amarillo	bacilos	-	-	-	-	-	+
60	Rizoide	Plana	Filamentoso	Crema	Cocos	+	-	-	-	+	+
61	Rizoide	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
62	Circular	Cóncava	Filamentoso	Transparente	cocos	-	-	-	+	+	-
63	Puntiforme	Plana	Entero	Naranja	cocos	-	-	-	-	+	+
64	Circular	Convexa	Ondulado	Blanco	Bacilos	-	-	+	+	+	-
65	Circular	Plana	Crenado	Café	Bacilos	+	-	-	+	+	+
66	Circular	Plana	Entero	Transparente	cocos	+	-	-	-	+	-
67	Puntiforme	Plana	Entero	Blanco	Bacilos	+	-	-	+	+	+
68	Puntiforme	Convexa	Entero	Blanco	Bacilos	+	-	-	-	+	+
69	Ameboide	Plana	Crenado	Transparente	Cocos	+	-	-	+	+	+
70	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	Bacilos	+	-	-	+	+	+
71	Circular	Cóncava	Ondulado	Transparente	bacilos	-	-	-	-	+	+
72	Circular	Convexa	Entero	Café	filamentos	+	-	-	-	+	+
73	Circular	Cóncava	Filamentoso	Café	Cocos	-	-	-	+	+	+
74	Circular	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
75	Ameboide	Plana	Lobulado	Blanco	cocos	-	-	-	-	+	-
76	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	cocos	+	-	-	-	+	+
77	Ameboide	Plana	Lobulado	Transparente	Filamentos	+	-	-	-	+	+
78	Puntiforme	Convexa	Entero	Transparente	cocos	-	-	-	-	-	+
79	Circular	Umbonada	Filamentoso	Café	cocos	+	-	-	+	+	+
80	Puntiforme	Convexa	Entero	Transparente	Bacilos	-	-	-	+	-	-
81	Circular	Convexa	Filamentoso	Café	cocos	+	-	-	-	+	+
82	Ameboide	Plana	Ondulado	Amarillo	Bacilos	-	-	-	+	+	+
83	Ameboide	Plana	Ondulado	Transparente	Bacilos	-	-	-	+	+	+



84	Circular	Umbonada	Entero	Café	cocos	+	-	-	+	-	+
85	Ameboide	Plana	Crenado	Blanco	bacilos	+	-	-	-	-	+
86	Ameboide	Plana	Entero	Transparente	Bacilos	+	-	-	+	+	+
87	Circular	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
88	Circular	Plana	Filamentoso	Café	bacilos	+	-	-	+	-	+
89	Ameboide	Convexa	Ondulado	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	-
90	Circular	Umbonada	Entero	Amarillo	Bacilos	-	-	-	-	+	+
91	Circular	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
92	Ameboide	Convexa	Lobulado	Amarillo	Bacilos	-	-	-	+	+	+
93	Circular	Convexa	Ondulado	Blanco	cocos	-	-	+	+	-	-
94	Puntiforme	Plana	Filamentoso	Rosa	cocos	+	-	-	+	+	+
95	Circular	Convexa	Entero	Blanco	bacilos	+	-	-	+	-	+
96	Circular	Plana	Filamentoso	Café	cocos	+	-	-	+	+	+
97	Circular	Plana	Lobulado	Café	cocos	+	-	-	+	-	-
98	Circular	Convexa	Ondulado	Café	cocos	-	-	-	-	+	+
99	Circular	Cóncava	Filamentoso	Café	cocos	+	-	-	+	+	-
100	Circular	Cóncava	Filamentoso	Café	cocos	+	-	-	+	+	-
101	Ameboide	Plana	Ondulado	Blanco	cocos	+	-	-	+	-	+
102	Rizoide	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
103	Circular	Umbonada	Filamentoso	Café	cocos	+	-	-	+	-	+
104	Circular	Plana	Ondulado	Café	Bacilos	-	-	-	+	+	+
105	Circular	Plana	Filamentoso	Blanco	bacilos	-	-	-	-	-	+
106	Rizoide	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
107	Circular	Cóncava	Ondulado	Blanco	Bacilos	+	-	-	+	+	+
108	Circular	Cóncava	Ondulado	Blanco	Bacilos	-	-	-	+	-	+
109	Puntiforme	Umbonada	Entero	Café	cocos	+	-	-	-	-	+
110	Puntiforme	Plana	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
111	Ameboide	Convexa	Ondulado	Café	cocos	+	-	+	+	+	+
112	Puntiforme	Plana	Ondulado	Transparente	cocos	+	-	-	-	+	+
113	Ameboide	Plana	Ondulado	Transparente	cocos	+	-	-	-	+	+
114	Rizoide	Plana	Filamentoso	Blanco	bacilos	-	-	-	+	+	+
115	Puntiforme	Convexa	Entero	Transparente	bacilos	-	-	-	+	+	+
116	Ameboide	Convexa	Ondulado	Café	cocos	+	-	+	-	+	+
117	Ameboide	Plana	Ondulado	Tornasol	Bacilos	+	-	-	-	+	+
118	Circular	Plana	Filamentoso	Gris	Bacilos	+	-	-	-	+	+
119	Ameboide	Elevada	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
120	Circular	Umbonada	Ondulado	Amarillo	cocos	-	-	-	+	+	+
121	Circular	Plana	Filamentoso	Café	bacilos	+	-	-	-	+	+
123	Circular	Umbonada	Entero	Transparente	Bacilos	-	-	+	+	+	+
124	Circular	Elevada	Ondulado	Gris	Filamentos	+	-	-	+	+	+
125	Circular	Convexa	Filamentoso	Rosa	cocos	-	-	-	+	+	+
126	Puntiforme	Plana	Entero	Café	cocos	+	-	-	+	+	+
127	Circular	Convexa	Ondulado	Amarillo	Bacilos	+	-	-	-	+	+
129	Circular	Plana	Filamentoso	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+



130	Puntiforme	Umbonada	Crenado	Azul	Bacilos	-	-	-	+	+	+
131	Ameboide	Elevada	Ondulado	Blanco	bacilos	+	-	-	+	+	+
132	Rizoide	Plana	Filamentoso	Blanco	Bacilos	-	-	-	+	+	+
134	Ameboide	Plana	Crenado	Transparente	Bacilos	-	-	+	+	+	+
135	Circular	Plana	Entero	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
136	Rizoide	Plana	Filamentoso	Rosa	cocos	-	-	-	+	+	+
137	Circular	Plana	Filamentoso	Rosa	bacilos	+	+	-	+	+	+
138	Circular	Plana	Entero	Verde	bacilos	+	-	-	+	+	+
140	Circular	Plana	Ondulado	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
141	Circular	Cóncava	Filamentoso	Café	cocos	+	+	-	+	+	-
142	Circular	Pulvinada	Entero	Café	bacilos	+	-	-	+	+	+
143	Ameboide	Umbonada	Ondulado	Café	bacilos	+	-	-	-	+	+
145	Circular	Cóncava	Entero	Café	bacilos	+	-	-	+	+	+
146	Circular	Convexa	Ondulado	Crema	cocos	+	-	-	+	+	+
147	Circular	Convexa	Ondulado	Naranja	Bacilos	-	-	-	+	+	-
148	Circular	Cóncava	Filamentoso	Café	cocos	+	-	-	+	+	+
149	Ameboide	Plana	Lobulado	Gris	cocos	+	-	-	-	+	+
150	Ameboide	Plana	Ondulado	Transparente	Bacilos	-	-	-	+	+	+
151	Circular	Convexa	Ondulado	Amarillo	Bacilos	-	+	-	+	+	+
152	Ameboide	Elevada	Enrollado	Transparente	bacilos	+	-	-	+	+	+
153	Circular	Umbonada	Ondulado	Transparente	bacilos	+	-	-	+	+	+
154	Circular	Plana	Ondulado	Café	cocos	+	-	-	+	+	+
155	Ameboide	Pulvinada	Ondulado	Crema	bacilos	-	-	-	-	+	+
156	Ameboide	Umbonada	Ondulado	Blanco	cocos	+	-	-	+	+	+
157	Circular	Convexa	Entero	Negro	bacilos	+	-	-	+	+	+
158	Circular	Convexa	Ondulado	Amarillo	cocos	+	-	-	+	+	-
159	Ameboide	Convexa	Lobulado	Amarillo	cocos	+	-	-	-	-	+
160	Ameboide	Umbonada	Lobulado	Transparente	bacilos	-	-	-	+	-	-
161	Circular	Umbonada	Entero	Amarillo	Bacilos	-	-	-	+	+	+
162	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	bacilos	-	-	-	+	+	+
163	Ameboide	Plana	Lobulado	Transparente	cocos	+	-	-	+	+	+
164	Circular	Plana	Ondulado	Negro	cocos	+	-	-	+	+	+
165	Circular	Convexa	Ondulado	Café	cocos	+	-	-	+	+	+
166	Puntiforme	Convexa	Entero	Negro	bacilos	-	-	-	+	+	-
167	Puntiforme	Pulvinada	Filamentoso	Blanco	bacilos	-	-	-	+	+	+
168	Circular	Cóncava	Ondulado	Blanco	bacilos	+	-	-	-	+	+
169	Ameboide	Cóncava	Ondulado	Transparente	cocos	+	-	-	+	+	+
170	Circular	Umbonada	Filamentoso	Blanco	Bacilos	+	-	-	+	+	+
171	Circular	Convexa	Entero	Transparente	cocos	+	-	-	+	+	+
172	Circular	Convexa	Entero	Naranja	bacilos	+	-	-	+	+	+
173	Circular	Plana	Entero	Amarillo	bacilos	-	-	-	+	+	+
174	Circular	Umbonada	Entero	Amarillo	Bacilos	+	-	-	+	+	+
175	Circular	Umbonada	Entero	Rosa	cocos	+	-	-	+	+	+
176	Ameboide	Plana	Ondulado	Café	Bacilos	-	-	-	+	+	+



177	Circular	Cóncava	Ondulado	Blanco	Bacilos	+	-	-	-	+	-
178	Circular	Convexa	Lobulado	Blanco	cocos	+	-	-	-	+	+
179	Circular	Convexa	Entero	Crema	bacilos	+	-	+	-	+	-
180	Circular	Umbonada	Crenado	Blanco	bacilos	-	-	+	-	+	+
181	Circular	Convexa	Ondulado	Amarillo	bacilos	-	-	-	-	+	+
182	Ameboide	Umbonada	Ondulado	Amarillo	cocos	+	-	-	-	+	+
183	Circular	Umbonada	Filamentoso	Rosa	bacilos	-	-	-	-	+	+
184	Ameboide	Plana	Ondulado	Rosa	bacilos	+	-	-	-	+	+
185	Circular	Convexa	Crenado	Blanco	Bacilos	-	-	+	-	+	+
186	Ameboide	Convexa	Entero	Transparente	Bacilos	-	-	-	+	+	-