



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**RECOMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES DE BACTERIAS Y
PROTOZOOS DE LA ZONA DE RAÍCES DE *MEDICAGO SATIVA*
DESPUÉS DE UN PULSO FUERTE DE CONTAMINACIÓN CON
PETRÓLEO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C LAURA MONDRAGÓN CAMARILLO

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. MIROSLAV MACEK
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**RECOMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES DE BACTERIAS Y
PROTOZOOS DE LA ZONA DE RAÍCES DE *MEDICAGO SATIVA*
DESPUÉS DE UN PULSO FUERTE DE CONTAMINACIÓN CON
PETRÓLEO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C LAURA MONDRAGÓN CAMARILLO

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. MIROSLAV MACEK
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO 2023



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/320/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de febrero de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la estudiante MONDRAGÓN CAMARILLO LAURA con número de cuenta 99220110 con la tesis titulada "Recomposición de las comunidades de Bacterias y Protozoos de la zona de raíces de *Medicago sativa* después de un pulso fuerte de contaminación con petróleo.", realizada bajo la dirección del DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. HOMERO JULIO EUDES CAMPO ALVES
Vocal: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH
Vocal: DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
Vocal: DR. ALEJANDRO ALARCON
Secretario: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 29 de marzo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al CONACyT por la beca otorgada (225463)

A mi tutor Dr. Salvador y a los miembros del comité tutor Dra. Nathalie y Dr. Miroslav

Índice

Índice de figuras	
Índice de tablas	
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Composición del petróleo	6
Redes tróficas del suelo	7
Bacterias	9
Protozoos	12
Fitorremediación	16
Hipótesis	17
Objetivos	17
Materiales y métodos	19
Diseño experimental	19
Contaminación de suelo	22
Determinación de la riqueza de especies de protozoos	22
Cuantificación de bacterias cultivables	24
Análisis molecular	25
Biomasa de <i>Medicago sativa</i>	28
Determinación de materia orgánica, nitrato, amonio y fósforo disponible	29
Análisis de los hidrocarburos totales	29
Análisis estadístico y cálculos	31
Resultados	32
Parámetros del suelo	32
Hidrocarburos totales	34
Biomasa de <i>Medicago sativa</i>	37
Estructura de la comunidad de ciliados y flagelados	40
Similitud entre las comunidades de ciliados y flagelados	50
Índices de diversidad	51
Grupos tróficos	52
Número de Unidades formadoras de colonia de bacterias (UFC)	57
DGGE de la comunidad de bacterias y ciliados	58
Secuencias	63
Análisis de correlación	69
Discusión	70
Parámetros del suelo	70
Degradación de hidrocarburos	71
Biomasa de <i>Medicago sativa</i>	72
Efecto del petróleo sobre la comunidad de ciliados y flagelados	73
Similitud	76
Índices de diversidad	77
Efecto del petróleo sobre los grupos tróficos de ciliados y flagelados	77
Efecto del petróleo sobre las UFC de bacterias	81
Análisis molecular	82
Conclusión	87
Referencias bibliográficas	88
Anexos	101

Índice de figuras

- Figura 1. Esquema de las redes tróficas del suelo (tomado de Geisen et al. 2016).....6
- Figura 2. Esquema de las redes tróficas en suelos contaminados (modificado de Geisen et al. 2016).....13
- Figura 3. Diseño del experimento. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....19
- Figura 4. Curva de acumulación de especies de ciliados y flagelados. Se usó el algoritmo de rarefacción en PC-ORD © (ver. 6 para Windows ©) para calcular el volumen de suelo apropiado para muestrear la mayoría de las comunidades de ciliados y flagelados antes de la contaminación del suelo con petróleo. La curva logarítmica normal es la proyección teórica del aumento de la riqueza de especies en función del aumento del volumen del suelo, y la línea de puntos superior e inferior indica la varianza de las especies. La línea hiperbólica representa las especies que aún faltan para lograr el 100% del censo de especies, y las líneas punteadas denotan el nivel de incertidumbre (Cortés-Pérez et al. 2018). Con base en este análisis, 40 g de suelo fue el tamaño de muestra óptimo para obtener alrededor del 80 % de las especies en el microcosmos.....21
- Figura 5. Parámetros del suelo Materia Orgánica (M.O), Nitrato, Amonio y Fósforo. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Las líneas de desviación estándar se muestran en la parte superior de las barras, cada barra representa la media de 3 réplicas.....31
- Figura 6. Hidrocarburos totales del petróleo TPH. Suelo contaminado (SP); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240. Las líneas de desviación estándar se muestran en la parte superior de las barras, cada barra representa la media de 3 réplicas.....32
- Figura 7. Concentraciones de hidrocarburos en los microcosmos. Suelo contaminado (SP); Suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Las líneas de desviación estándar se muestran en la parte superior de las barras, cada barra representa la media de 3 réplicas. Hidrocarburos: dodecano (C12), tridecano (C13), tetradecano (C14), pentadecano (C15), hexadecano (C16), heptadecano (C17), octadecano (C18), nonadecano (C19), eicosano (C20), heneicosano (C21), docosano (C22), tricosano (C23), tetracosano (C24), pentacosano (C25) y hexacosano (C26).....34
- Figura 8. Biomasa total de *Medicago sativa*. Cada barra representa la media de 3 réplicas con error estándar. A) Biomasa total peso seco. B) Biomasa peso seco de Raíces (R), Tallos (T) y Hojas (H). Suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....36

Figura 9. <i>Medicago sativa</i> en diferentes días. Suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	37
Figura 10 A) Riqueza de especies de ciliados y flagelados detectada en microcosmos a lo largo de 240 días. B) Abundancia de especies de ciliados y flagelados. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	46
Figura 11. Géneros de ciliados y flagelados más comunes en todos los microcosmos. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	48
Figura 12. Análisis de similitud de la comunidad de ciliados y flagelados. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. En los rectángulos con color se muestra la agrupación de los tratamientos con más del 60% de similitud.....	49
Figura 13. Abundancia de ciliados y flagelados bacterívoros. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	51
Figura 14. Abundancia de grupos tróficos de la comunidad de ciliados y flagelados detectados en los microcosmos durante 240 días. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Osmótrofos, omnívoros, fungívoros-bacterívoros, depredadores, autótrofos y alguívoros.....	54
Figura 15. Número de unidades formadoras de colonia UFC por gramo de suelos. Cada barra representa la media de 3 réplicas con error estándar. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	55
Figura 16. Perfiles de DGGE de la comunidad de bacterias. Análisis de similitud de presencia-ausencia de bandas de los perfiles de DGGE de la comunidad de bacterias. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. En los rectángulos con color se muestra la agrupación de los tratamientos con más del 50% de similitud.....	56
Figura 17. Perfiles de DGGE de la comunidad de ciliados. Análisis de similitud de presencia-ausencia de bandas de los perfiles de DGGE de la comunidad de ciliados. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. En los rectángulos con color se muestra la agrupación de los tratamientos con más del 50% de similitud.....	58

Figura 18. Análisis ventana corrediza (MWA- Moving Windows Analysis) y tasa de cambio (Δ_t) de la comunidad de bacterias.....	60
Figura 19. Análisis ventana corrediza (MWA- Moving Windows Analysis) y tasa de cambio (Δ_t) de la comunidad de ciliados.....	60
Figura 20. Árbol filogenético construido con las secuencias de bacterias del gen 16S rRNA y secuencias del GENBANK construidas mediante el método Neighbor-joining	62
Figura 21. Árbol filogenético construido con las secuencias de ciliados del gen 18S rRNA y secuencias del GENBANK construidas mediante el método Neighbor-joining.....	65
Figura 22. Biplot del análisis de correlación canónica (CCA) que muestra la distribución de especies de ciliados y flagelados con los factores ambientales. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Materia orgánica (M.O), Hidrocar (hidrocarburos totales), FO (Fósforo disponible).....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	24
Tabla 2. Frecuencia de flagelados y ciliados. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Grupo trófico (GT). Autótrofos (Au), Alguívoros (Al), Bacterívoros (B), Osmótrofos (Os), Omnívoros (O), Depredadores (D) y Fungívoros-bacterívoros (FB). La clasificación de los grupos se basó en Ad et al. 2019.....	39
Tabla 3. Índices de diversidad. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	50
Tabla 4. Riqueza ponderada por rango (Rr) de bacterias. Grupo control (S), suelo contaminado (SP); suelo plantado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	57
Tabla 5. Riqueza ponderada por rango (Rr) de ciliados. Grupo control (S), suelo contaminado (SP); suelo plantado con <i>M. sativa</i> (SM); suelo contaminado sembrado con <i>M. sativa</i> (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.....	59
Tabla 6. Identidades de bacterias detectados mediante la secuenciación de las bandas de los perfiles de DGGE.....	62
Tabla 7. Identidades de ciliados detectados mediante la secuenciación de las bandas de los perfiles de DGGE.....	66

Resumen

La contaminación de los suelos por petróleo afecta las propiedades físicas, químicas, y biológicas, dentro de esta última hay una pérdida de la diversidad microbiana, lo que causa la disminución o la pérdida de funciones de los microorganismos en estos suelos contaminados. Los protozoos responden rápidamente al incremento de la población de bacterias, liberando nutrientes secuestrados en su biomasa como producto de la depredación, fomentando la mineralización y reincorporación de carbono en el ciclo de nutrientes. La fitorremediación acelera la degradación de los hidrocarburos, al promover la actividad de bacterias, protozoos y otros microorganismos. Las preguntas de investigación en este trabajo fueron ¿Cuál es el efecto del petróleo sobre la estructura de la comunidad de protozoos y bacterias, a corto y largo plazo? y ¿Cómo se reestructura la comunidad de bacterias y protozoos después de un pulso fuerte de petróleo en presencia de *Medicago sativa*? Para contestar estas preguntas se tuvieron 78 microcosmos divididos en 4 grupos: 1) suelo control (S), 2) suelo sembrado con *M. sativa* (SM), 3) suelo contaminado con 50g/kg de petróleo (SP), y 4) suelo contaminado con petróleo con *M. sativa* (SPM). Se determinó el número de UFCs de bacterias cultivables, la abundancia de especies, y los grupos tróficos de ciliados y flagelados a los 0, 7, 14, 30, 60, 120 y 240 días; así como la estructura de la comunidad mediante la herramienta molecular de DGGE, y la concentración de hidrocarburos totales. Las UFC de bacterias, la diversidad de ciliados y flagelados disminuyeron inmediatamente después del pulso de la contaminación. Después de 7 días, las UFC de bacterias y la diversidad y grupos tróficos de ciliados y flagelados se recuperaron. Los géneros *Colpoda*, *Spumella*-like resistieron a la contaminación y junto con *Bodo* y *Cercomonas* fueron los más abundantes en todos los microcosmos; el grupo trófico bacterívoro incrementó su riqueza de

especies después de la contaminación. *Medicago sativa* promovió la recuperación en menor tiempo, de la comunidad y grupos tróficos, y la mayor disminución de hidrocarburos. Las bacterias identificadas mediante DGGE correspondieron a los géneros *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Chryseolinea*, *Luteimonas*, *Luteitalea*, *Lysobacter*, *Pontibacter*, *Steroidobacter*, y *Vicinamibacter*, estas se presentaron en todos los tratamientos, mientras que *Colpoda*, *Gonostomum*, *Oxytricha* y *Urosoma* fueron los géneros de ciliados predominantes. El petróleo ejerció una fuerte selección en la comunidad microbiana y promovió una composición alternativa de la comunidad de protozoos; *M. sativa* promovió una recuperación más rápida de la comunidad de bacterias y protozoos, así como mayor disminución del petróleo en el suelo.

ABSTRACT

Soil contamination by petroleum affects the physical, chemical, and biological properties, within the latter there is a loss of microbial diversity, which causes the decrease or loss of functions of microorganisms in these contaminated soils. Protozoa respond rapidly to the increase in the bacterial population, releasing nutrients sequestered in their biomass as a product of predation, promoting mineralization and reincorporation of carbon into the nutrient cycle. Phytoremediation accelerates hydrocarbon degradation by promoting the activity of bacteria, protozoa and other microorganisms. The research questions in this work were: What is the effect of petroleum on the structure of the community of protozoa and bacteria, in the short and long term? and how is the community of bacteria and protozoa restructured after a strong petroleum pulse in the presence of *Medicago sativa*? To answer these questions, 78 microcosms were divided into 4 groups: 1) control soil (S), 2) soil planted with *M. sativa* (SM), 3) soil contaminated with 50g/kg of petroleum (SP), and 4) petroleum contaminated soil with *M. sativa* (SPM). The number of CFUs of culturable bacteria, the abundance of species, and the trophic groups of ciliates and flagellates were determined at 0, 7, 14, 30, 60, 120, and 240 days; as well as the structure of the community using the DGGE molecular tool, and the concentration of total hydrocarbons. The CFU of bacteria, the diversity of ciliates and flagellates decreased immediately after the contamination pulse. After 7 days, the CFU of bacteria and the diversity and trophic groups of ciliates and flagellates recovered. The *Colpoda* and *Spumella*-like genera resisted contamination and together with *Bodo* and *Cercomonas* were the most abundant in all microcosms; the bacterivorous trophic group increased its species richness after contamination. *Medicago sativa* promoted the recovery in less time, of the community and trophic groups, and the

greatest reduction of hydrocarbons. The bacteria identified by DGGE corresponded to the genera *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Chryseolinea*, *Luteimonas*, *Luteitalea*, *Lysobacter*, *Pontibacter*, *Steroidobacter*, and *Vicinamibacter*, these occurred in all treatments, while *Colpoda*, *Gonostomum*, *Oxytricha*, and *Urosoma* were the genera of ciliates predominant. Petroleum exerted strong selection on the microbial community and promoted an alternative composition of the protozoan community; *M. sativa* promoted a faster recovery of the community of bacteria and protozoa, as well as a greater decrease in petroleum in the soil.

INTRODUCCIÓN

El suelo es muy complejo en su estructura y función debido a la forma en que se acoplan los componentes minerales y biológicos, los que en conjunto generan las diferentes regiones funcionales. El suelo es fundamental e irremplazable, en él se basa la productividad de los ecosistemas terrestres (Nannipieri et al. 2003); es probablemente el ecosistema más diverso en el planeta por albergar una amplia diversidad de microorganismos (Buckley y Schmidt 2002; Rasche y Cadisch 2013). Los microorganismos desempeñan un papel crucial en numerosas funciones clave de los ecosistemas: están involucrados en la fertilidad del suelo, la calidad ambiental y calidad del agua (Maron et al. 2018). La mayor parte del flujo energético y las transformaciones en los ciclos de los nutrientes como carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) proviene de la actividad microbiana (Mittal y Rockne 2012; Rutherford y Juma 1992).

Las actividades antropogénicas con frecuencia afectan negativamente la calidad del agua, aire y suelo (Streche et al. 2018). En particular, México es uno de los países productores de petróleo, por lo que las fugas y derrames accidentales ocurren con regularidad en la producción, refinación, transporte y almacenamiento del petróleo y los productos derivados del mismo (Das y Chandran 2011; Singh et al. 2012). El 40% de las emergencias ambientales en México son causadas por derrames de petróleo y sus derivados; por estos motivos, existen extensas áreas contaminadas con petróleo (Cavazos-Arroyo et al. 2014). La contaminación por petróleo destruye la fertilidad del suelo, primero genera una serie de cambios físicos por contacto, ya que se forma una capa impermeable en la superficie que impide la circulación del agua y el intercambio de gases en el suelo, provocando la asfixia de las raíces de las plantas. A medida que el ambiente se vuelve anaerobio, la actividad metabólica de la

comunidad microbiana disminuye, mientras que los diferentes componentes del petróleo inhiben a muchos miembros de la comunidad mediante alteraciones en la membrana que causan daño a las funciones de estos, lo que produce la inhibición del crecimiento y lisis celular. Además, se genera un desequilibrio de nutrimentos como el nitrógeno y fósforo generado por el exceso de materia orgánica derivada del petróleo (Galitskaya et al. 2021; Streche et al. 2018). Los cambios negativos que generan los hidrocarburos se dan a corto plazo, estos están relacionados con el efecto inmediato de los hidrocarburos en la comunidad microbiana, la pérdida de la diversidad y por tanto las funciones microbianas, estos se observan en días y algunas semanas. Los cambios a largo plazo tienen están relacionados con el tiempo que permanecen en el suelo, hidrocarburos de bajo peso molecular se degradan en menor tiempo mientras que los de alto peso molecular permanecerán en el suelo durante un largo período debido a su alta hidrofobicidad. La gravedad de estos efectos negativos sobre la biota del suelo depende de la frecuencia, duración, tipo e intensidad de los eventos de contaminación por hidrocarburos (Das y Chandran 2011; Robertson et al. 2007; Van Hamme et al. 2003).

Composición del petróleo

Los hidrocarburos de petróleo contienen una mezcla compleja de compuestos, se pueden clasificar en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos. Todos estos compuestos difieren en volatilidad y en susceptibilidad a la degradación, algunos compuestos se degradan fácilmente, otros resisten la degradación en el corto plazo y algunos son biodegradables en el largo plazo. Los n-alcenos de longitud intermedia (C 10 -C 25) son los sustratos preferidos para los microorganismos y tienden a ser los más fácilmente degradables, mientras que los compuestos de cadena más corta son más tóxicos. Los alcanos de cadena

larga (C 25 -C 40) son sólidos e hidrofóbicos, por lo que son difíciles de degradar debido a su escasa solubilidad en agua y biodisponibilidad. Los alcanos y cicloalcanos de cadena ramificada también se degradan más lentamente. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y los alquitranes tienen mayor resistencia a la degradación. Uno de los principales componentes del petróleo son los alcanos, estos son moléculas lineales saturadas cuya longitud de cadena puede variar de 1 (metano) a más de 50 átomos de carbono. Los alcanos son los principales componentes de los combustibles derivados del petróleo, constituyen alrededor del 20-50% del petróleo crudo, dependiendo del tipo de petróleo (Labinger y Bercaw 2002; Rojo 2010; Zampolli et al. 2014).

Redes tróficas del suelo

Los organismos llevan a cabo diferentes funciones en el suelo y se les ha nombrado dependiendo de la función que realicen el mismo, por ejemplo, las bacterias y los hongos son considerados como ingenieros químicos en el suelo, son responsables de la descomposición de la materia orgánica (MO), participan en el ciclo de nutrientes y regulando el 90% del flujo de energía. Desempeñan un papel clave en la biorremediación del suelo, al degradar sustancias tóxicas a través de vías. Los reguladores biológicos como protozoos, nematodos, colémbolos y ácaros son responsables de la dinámica poblacional a través de la depredación. Las lombrices de tierra, hormigas y termitas son consideradas los ingenieros del suelo y son responsables de la modificación física del suelo y de la regulación de la disponibilidad de recursos para otras especies, manteniendo la estructura del suelo mediante la formación de poros y la agregación o transporte de partículas (Bonkowski et al. 2009; Saccá et al. 2017).

Las redes tróficas representan la distribución de los enlaces tróficos entre las poblaciones de los ecosistemas, además de lo que restringe el flujo de energía a través de una comunidad

desde el nivel basal (autótrofos) hasta los principales depredadores (Thompson et al. 2012). El suelo tiene algunas diferencias respecto a otros tipos de hábitat, una de ellas son los compartimentos, ya que tiene un espacio fuertemente estructurado compuesto por la capa de hojarasca y los poros del suelo (Coleman et al. 2004). La comunidad del suelo también está fuertemente estructurada en tamaño e incluye microfauna basal pequeña (protozoos y nematodos), mesofauna (microartrópodos y enquitreidos) y macrofauna (escarabajos, milpiés y lombrices de tierra). Esta fuerte compartimentación en clases de tamaño tiene efectos profundos para las interacciones de las especies (Digel et al. 2014) (Figura 1).

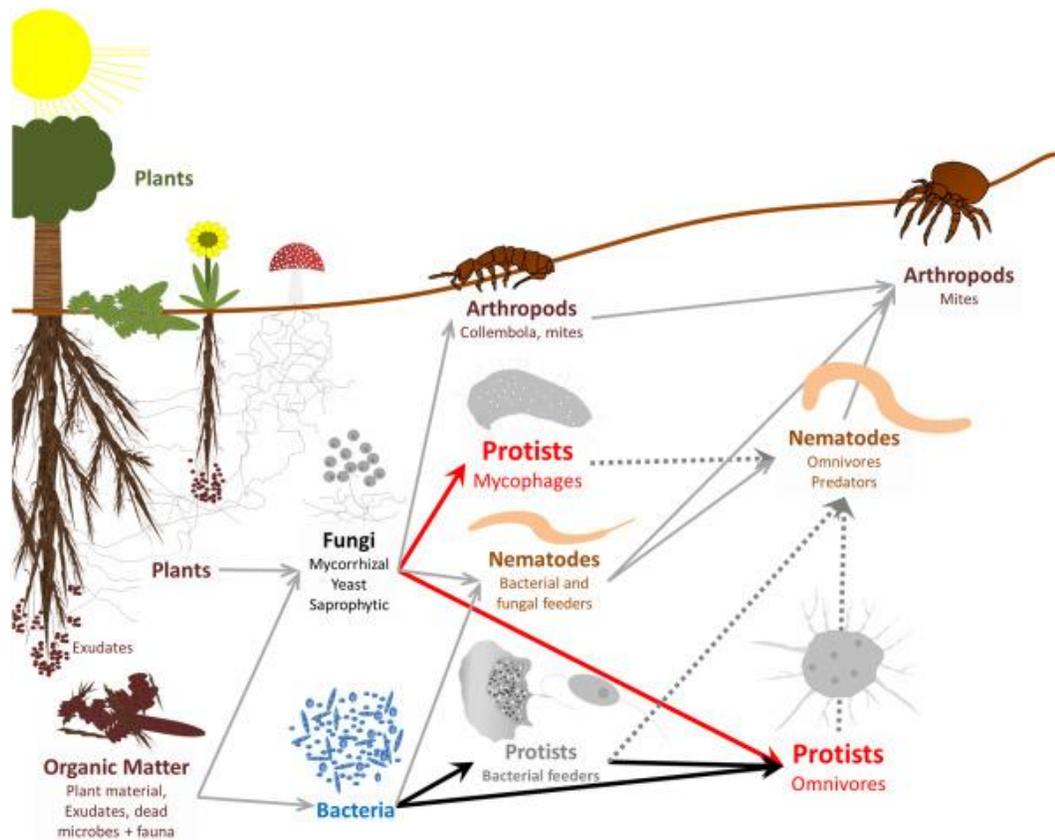


Figura 1. Esquema de las redes tróficas del suelo (tomado de Geisen et al. 2016)

En las redes tróficas del suelo se tienen tres vías energéticas básicas: plantas, bacterias y hongos. La mayoría de la entrada de carbono se da a través de las raíces de las plantas y en menor medida a través de la hojarasca, por lo que los depredadores microbianos como los protozoos y nematodos son de suma relevancia debido a que se alimentan de bacterias y hongos, con esta actividad canalizan la energía a los niveles tróficos superiores a través de dos rutas distintas, el canal de energía bacteriana y fúngica (Bonkowski 2004, 2009; Ekelund y Ronn 1994; Geisen 2016). Estos depredadores microbianos también pueden alimentarse de otros grupos de organismos en el suelo, por ejemplo, los protozoos y nematodos omnívoros se alimentan de una amplia variedad de presas además como algas, rotíferos y nematodos pequeños, además de bacterias y hongos. Esta actividad de depredación regula los flujos de energía y de nutrientes en las redes tróficas del suelo (Bonkowski et al. 2009; Neher 2010).

Bacterias

Las bacterias son los microorganismos más abundantes del suelo, un gramo de este puede contener hasta 1×10^9 . Estas son fisiológicamente diversas, en las interacciones que se llevan a cabo en la zona de raíces de las plantas juegan un papel fundamental en la transformación y movilización de nutrientes. Entre sus muchas funciones en el suelo ayudan a estimular el crecimiento de las plantas, por ejemplo, a través de la producción de hormonas vegetales; también ayudan a controlar o inhibir la actividad de patógenos de plantas; además mejoran la estructura del suelo (Hayat et al. 2010). Más recientemente, las bacterias también se han utilizado en el suelo para la mineralización de contaminantes orgánicos, debido a que muchas especies de estas pueden utilizar como fuente de energía una amplia gama de sustratos

incluidos los hidrocarburos, bajo una gran variedad de aceptores de electrones (Van Hamme et al. 2003).

La degradación más rápida y completa de la mayoría de los hidrocarburos se produce en condiciones aerobias, sin embargo, también se realiza en condiciones anaerobias (Heider y Schühle 2013; Laczi et al. 2020). Las bacterias utilizan el oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones en condiciones aerobias. También, las bacterias secretan diversos surfactantes que facilitan la emulsificación de los hidrocarburos. Estos surfactantes probablemente también tienen otras funciones, como facilitar la motilidad celular en superficies sólidas o la adhesión/desprendimiento de superficies o biopelículas (Hommel 1990).

Las bacterias con metabolismo aerobio utilizan enzimas monooxigenasas y dioxigenasas que transfieren uno o dos átomos de oxígeno al sustrato, tienen un papel central en la bioconversión óxica de los hidrocarburos. Por ejemplo, las oxigenasas que se activan en la degradación de los alcanos dependen del número de átomos de carbono, para hidrocarburos de cadena corta se activan las enzimas relacionadas con las metano monooxigenasas (C2–C4), en alcanos de cadena media (C5–C16) están relacionadas las alcano hidroxilasas tipo AlkB y citocromos P450 (C5–C16), y en alcanos de cadena larga (mayores a C16) se activan las enzimas dioxigenasas, están también se activan en la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Dubbels et al. 2007; Kanaly y Harayama 2000; Kotani et al. 2007; Marchant et al. 2006; Van Beilen y Funhoff 2007). También en la degradación de los HAPs las enzimas mono y dioxigenasas son las que catalizan reacciones de hidroxilación que activan los anillos aromáticos mediante la adición de átomos de oxígeno molecular a uno o más átomos de carbono del sustrato (Haddock 2010). Algunas bacterias poseen una o varias

de estas familias de enzimas para degradar hidrocarburos, bacterias Gram-positivas como *Gordonia*, *Geobacillus*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* pueden degradar hidrocarburos de cadena media y larga (C36) (Quatrini et al. 2008). Incluso se han encontrado bacterias que tienen más de una enzima que ayudan a la degradación de los hidrocarburos, por ejemplo, la cepa de *Mycobacterium chubuense* tiene una gran cantidad de enzimas monooxigenasas, un citocromo P450 e hidroxilasas AlkB (McCarl et al. 2018). También, bacterias Gram-negativas poseen este tipo de enzimas como los géneros *Alcanivorax*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* (Crampon et al. 2018; Wentzel et al. 2007).

Las bacterias con metabolismo anaerobio degradan los hidrocarburos de tipo alcano por medio de adición de fumarato, este se adhiere al enlace carbono-carbono, formando alquilsuccinato (Kropp et al. 2000; Rabus et al. 2001). La adición de fumarato ocurre en la posición subterminal C2 de un determinado alcano, posteriormente los alquilsuccinatos se transforman mediante una transposición del esqueleto de carbono. Seguido de la descarboxilación, se producen ácidos grasos ramificados que pueden entrar a la β -oxidación y otras rutas metabólicas centrales (Widdel y Grundmann 2010). Existen varios metabolitos que indican el consumo de alcanos en condiciones anaerobias que son indicadores de la adición del fumarato a este grupo de hidrocarburos. Estos metabolitos incluyen el metil y dimetil-benzilsuccinatos y los alquilsuccinatos derivados de alcanos C6-C9, cuya presencia confirma la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos del petróleo (Li et al. 2012). Se ha sugerido que con la adición de fumarato también puede ser posible la oxidación de metano por la vía anaerobio. Otros mecanismos alternativos a la adición de fumarato sugieren una

carboxilación en la posición C3 de un n-alcano, seguido de la eliminación del grupo acetato por un mecanismo desconocido (Thauer y Shima 2008).

La degradación de HAPs en condiciones anaeróbicas es difícil debido a la lenta tasa de crecimiento de las bacterias anaerobias y al bajo rendimiento energético en los procesos metabólicos, sin embargo, algunas de estas degradan los HAPs en condiciones de reducción de nitrato, reducción de sulfato, reducción de hierro y metanogénesis. Las vías de degradación de los HAPs en condiciones anaerobias no han sido del todo descritas, se han propuesto al menos tres mecanismos diferentes en la activación de HAPs: hidroxilación, carboxilación y metilación particularmente del naftaleno, aunque la carboxilación se ha propuesto como el paso inicial en la degradación de este compuesto (Dhar et al. 2020; Heider y Schühle 2013). La carboxilación consiste en la adición de CO₂ a un aceptor, como producto se obtiene ácido 2-naftoico el cual se reduce a ácido tetralina-2-carboxílico y posteriormente a decahidro-2-naftoico (Annweiler et al. 2000; Heider y Schühle 2013; Rockne et al. 2000; Zhang y Young 1997).

Protozoos

Los protozoos son los organismos eucariontes más diversos y abundantes en el suelo, normalmente presentan densidades de 10⁴ a 10⁷ por gramo de suelo (Adl y Coleman 2005). Estos contribuyen a la descomposición y mineralización de la materia orgánica, nitrógeno y fósforo a través de diversos grupos tróficos (Adl y Gupta 2006). Los protozoos tradicionalmente se han agrupado en cuatro grandes grupos morfológicos amebas desnudas, amebas testadas, ciliados y flagelados. Cada uno de estos grupos tiene estrategias diferentes para la obtención de la energía y son un grupo importante de depredadores de una gran variedad de presas.

De los cuatro grupos morfológicos, los flagelados son los más abundantes en el suelo, son un grupo diverso que se alimentan principalmente de bacterias. Debido a sus altas tasas de crecimiento responden rápidamente a cambios en el número de bacterias, incluso pueden cambiar la composición de las comunidades bacterianas en el suelo (Ekelund y Rønn 1994; Rønn et al. 2002). Los flagelados bacterívoros más comunes incluyen kinetoplástidos, crisomonadidos y algunos miembros de cercozoa (Foissner 1991a). Además de bacterívoros también hay flagelados osmótrofos, estos absorben materia orgánica disuelta presente en su entorno (Adl 2003; Leadbeater and Green 2000), este tipo de flagelados osmótrofos carecen de una forma alternativa de adquirir energía, son muy pobres en la descomposición de sustratos y son osmótrofos estrictos, estos dependen de los nutrientes disueltos. Algunos euglénidos aplastídicos son osmótrofos, también algunas clorófitas de los géneros *Polytomella*, *Polytoma*, *Prototheca* son estrictamente osmótrofos (Adl et al. 2019). Otros flagelados son autótrofos como clorófitas del género *Haematococcus*; algunas son tanto autótrofas como heterótrofas bajo ciertas condiciones, por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii* puede crecer también en ausencia de luz de forma heterótrofa en presencia de acetato (Heifetz et al. 2000; Yang et al. 2014). Los euglénidos como *Peranema* spp. también pueden ser depredadores de otros flagelados (Triemer 1997).

Los ciliados son importantes miembros de la comunidad microbiana del suelo, se caracterizan por tener dimorfismo nuclear, cada célula posee micronúcleos y macronúcleos de tamaño y función claramente diferentes dentro del mismo citoplasma. El macronúcleo, que suele ser poliploide, se divide amitóticamente durante la reproducción asexual y controla principalmente las funciones somáticas (por ejemplo, la síntesis de ARN). El micronúcleo diploide está activo principalmente durante la reproducción sexual (conjugación) (Foissner

1999). Muchos ciliados pueden formar quistes para sobrevivir en condiciones adversas, estos quistes pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo contribuyendo a su dispersión (Finlay et al. 2000; Foissner 1997). Los ciliados tienen un papel muy importante en ciclo de nutrientes, también regulan el tamaño y la composición de las comunidades bacterianas, además estimulan la amonificación y la nitrificación (Griffiths 1986). Más allá de su papel más conocido como consumidores de bacterias, también los ciliados pueden alimentarse de hongos y levaduras (fungívoros), algunos géneros como *Grossglockneria* y *Fungiphrya* son fungívoros (Aescht et al. 1991; Foissner, 1999b). Otros ciliados se alimentan de algas (alguívoros), ejemplos de estos son algunos miembros de los géneros *Trithigmotoma*, *Thigmogaster* y *Chilodontopsis* (Risse-Buhl y Küsel 2009). Algunos otros ciliados son depredadores de otros protozoos o incluso de metazoos (Coûteaux y Darbyshire 1998; Geisen y Bonkowski 2017; Vaerewijck et al. 2008).

En general todos los protozoos bacterívoros responden rápidamente al incremento poblacional de las bacterias, liberando nutrientes secuestrados en la biomasa bacteriana como subproducto de la depredación, lo que acelera la mineralización del carbono y su reincorporación en el ciclo de nutrientes (Clarholm 1981; Finlay et al. 2000). La importancia en el ciclo del N se debe a que su proporción carbono/ nitrógeno es más baja que la de las bacterias, por lo que el efecto neto es la liberación de nitrógeno que puede ser absorbido rápidamente por las raíces de plantas y otros microorganismos del suelo (Bonkowski 2004; Hodge et al. 1998).

A su vez, los protozoos del suelo son depredados por los organismos de los niveles superiores de las redes tróficas del suelo, para quienes son una fuente muy importante de nutrientes y energía. En general los microorganismos del suelo se ven afectados por la contaminación por

petróleo, lo que afecta los enlaces de las redes tróficas (Figura 2). Algunos protozoos toleran la toxicidad al petróleo, estos tienen un papel importante en la metabolización de estos contaminantes mediante el consumo de bacterias que se alimentan del petróleo (Stoeck y Edgcomb 2010). Tanto la metabolización como la mineralización de los hidrocarburos dependen en gran medida de la red de interacciones tróficas entre varios tipos de microorganismos del suelo (Lara et al. 2007a). Las comunidades de protozoos en suelos con petróleo presentan cambios similares a las comunidades bacterianas, pues solo incrementa el número de individuos de las especies que pueden tolerar los hidrocarburos y consumir los recursos disponibles, por lo que hay una reducción en la riqueza de especies de protozoos (Cortés-Pérez et al. 2014; Lara et al. 2007a; Lara et al. 2007b).

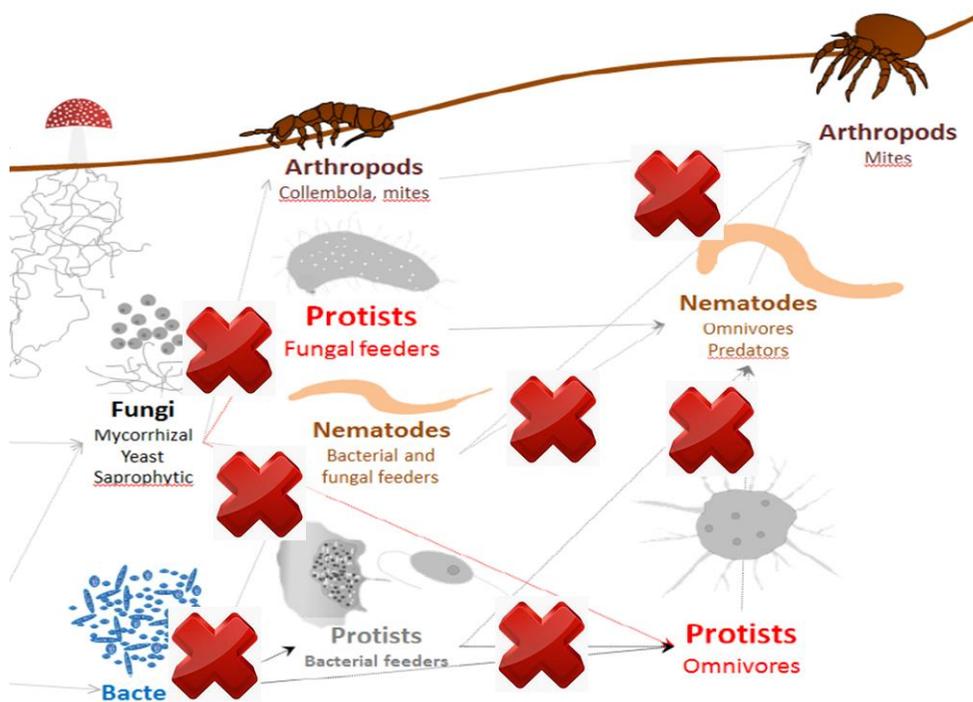


Figura 2. Esquema de las redes tróficas en suelos contaminados (modificado de Geisen et al. 2016)

Fitorremediación

La fitorremediación se ha utilizado ampliamente para extraer y eliminar contaminantes o reducir su biodisponibilidad en el suelo (Kuiper et al. 2004; Pilon-Smits 2005; Yan et al. 2020). Las plantas tienen la capacidad de absorber contaminantes en el suelo incluso en bajas concentraciones a través de su sistema de raíces. Las plantas extienden su sistema de raíces hacia la matriz del suelo estableciendo un sistema de rizosfera en donde las raíces exudan compuestos orgánicos nutritivos que influyen en la abundancia, diversidad, o actividad potencial de microorganismos que degradan hidrocarburos, incluso las plantas a través de las raíces acumulan metales pesados en diferentes partes de la planta, recuperando así el suelo contaminado y estabilizando la fertilidad del suelo (Anderson et al. 1993; Panchenko et al. 2017; Yan et al. 2020).

La actividad de los microorganismos en la zona de raíces depende de la cantidad y tipo de exudados de las plantas (Xiaoyun Chen et al. 2007; Hall et al. 2011). Los microorganismos de la zona de raíces pueden incrementar de dos a cuatro veces en orden de magnitud (Salt et al. 1998; Watt et al. 2006). También, los exudados de las raíces incrementan la actividad microbiana y en los suelos contaminados con hidrocarburos pueden incrementar la metabolización de estos a lo largo de las raíces en crecimiento (Anderson et al. 1993; Xiaoyun Chen et al. 2007; Phillips et al. 2012a). Por ello, los microorganismos que colonizan la raíz juegan un papel importante en el proceso de fitorremediación (Siciliano y Germida 1997), la cual podría ser más eficaz durante las etapas de crecimiento, ya que en esta etapa del desarrollo, las raíces tienen mayor abundancia de bacterias que pueden degradar hidrocarburos (Nie et al. 2011).

El exceso de carbono que originan los hidrocarburos en el suelo produce un déficit en la disponibilidad de los principales nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo. Para resolver este problema se han utilizado plantas leguminosas como *Medicago sativa* se ha utilizado en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos debido a que es una planta de rápido crecimiento con un extenso sistema de raíces con capacidad de asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno (Agnello et al. 2016). Lo que permite que las plantas crezcan en un ambiente con un suministro de nitrógeno disminuido. En consecuencia, estas plantas también facilitan el crecimiento de otras plantas aliviando el estrés edáfico producido por los hidrocarburos (Graj et al. 2013). Por otro lado, en la zona de raíces de *M. sativa* se ha registrado un incremento significativo del número de bacterias y protozoos en suelos contaminados con diferentes hidrocarburos (Cortés-Pérez et al. 2014; Fan et al. 2008; Kirk et al. 2005a; Muratova et al. 2003a; Panchenko et al. 2017). La introducción de nitrógeno recién fijado puede comenzar a contrarrestar el exceso de carbono y, una vez que los contaminantes se hayan transformado en biomasa microbiana, los depredadores microbianos continuarán la movilización de nutrientes.

La fitorremediación se basa en la promoción de la actividad microbiana a través de los exudados de las raíces de las plantas, que da como resultado el incremento de la biomasa microbiana y reduce el desbalance de nutrientes causados por el exceso de carbono del petróleo. Es necesario profundizar en los mecanismos de interacción planta-microorganismo en la fitorremediación. Por lo tanto, en este trabajo se plantearon las siguientes preguntas: ¿Cuál es el efecto del petróleo sobre la estructura de la comunidad de protozoos y bacterias a corto y largo plazo? ¿Cómo se reestructura la comunidad de bacterias y protozoos después de un pulso fuerte de petróleo en presencia de *M. sativa*?

Hipótesis

- Si el petróleo tiene un efecto negativo sobre las comunidades microbianas, entonces habrá una disminución en los miembros de la comunidad de bacterias y protozoos en corto tiempo, pero éstos se recuperarán en el largo plazo.
- Si los exudados de *Medicago sativa* influyen de manera positiva, entonces habrá mayor abundancia de la comunidad de bacterias y protozoos en los tratamientos con esta planta. Por ello, el parecido entre las comunidades bajo la influencia de *M. sativa* será mayor que el desarrollado en el suelo sin planta, independientemente de la contaminación con petróleo.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la recomposición de las comunidades de bacterias y protozoos de la zona de raíces de *Medicago sativa* después de un pulso fuerte de contaminación con petróleo

Objetivos particulares

- a) Determinar y comparar los parámetros (materia orgánica, nitrato, amonio y fósforo disponibles) de los tratamientos (Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM)) de los días 0,7,14,30,60,120 y 240.
- b) Comparar la concentración de hidrocarburos totales de los tratamientos con petróleo SP y SPM.
- c) Comparar la biomasa de *Medicago sativa* en los tratamientos SM y SPM.
- d) Determinar la riqueza y abundancia de especies morfológicas de protozoos (ciliados y flagelados) de los cuatro tratamientos a lo largo de todo el experimento.
- e) Comparar el número de UFC de las bacterias de los diferentes tratamientos.

f) Evaluar y comparar la diversidad de la comunidad de bacterias y protozoos mediante la técnica molecular DGGE de los diferentes tratamientos a lo largo de todo el experimento.

Materiales y métodos

El suelo se recolectó de un campo de cultivo de maíz en el municipio de Tultitlán, Estado de México, sin antecedentes de contaminación por petróleo. La recolección de este material se llevó a cabo mediante una muestra compuesta de 10 sitios, dentro del campo de cultivo, alejados 10 m cada uno. Las muestras se homogeneizaron en un solo volumen, y la mezcla mostró las siguientes características: textura migajón arcillosa (50% arena, 26% arcilla, 24% limo), con pH 7.62, materia orgánica 7.99 %, NH_4^+ 3.16 mg kg^{-1} , NO_3^- 2.05 mg kg^{-1} , y fósforo disponible 4.63 mg kg^{-1} .

Diseño experimental

Se prepararon 78 microcosmos con 1 kg de suelo, los cuales se asignaron aleatoriamente a cada uno de los 4 grupos de trabajo (Tratamientos): 1) el control (S) incluyó solo el suelo de cultivo, sin planta y sin petróleo; 2) el tratamiento con *Medicago sativa* (SM) incluyó 50 semillas de esta planta sembradas a 4 mm de profundidad en el suelo libre de petróleo; 3) el tratamiento de la contaminación con petróleo (SP) incluyó solo el suelo de cultivo con 50g/kg de petróleo crudo ligero (Istmo API 32), el cual se obtuvo por donación de la refinería de Tula Hidalgo; y 4) el tratamiento de suelo con petróleo y con *M. sativa* (SPM) incluyó el suelo contaminado con 50g/kg de petróleo ligero más 50 semillas de *M. sativa* a 4 mm de profundidad.

Todos los microcosmos se mantuvieron en condiciones de invernadero con temperatura promedio de 23°C, y humedad relativa de 70%, sin control del fotoperiodo. El suelo de los microcosmos se mantuvo al 60 % de su capacidad de campo mediante la adición de agua estéril cada día. La cantidad de agua a suplementar se determinó mediante la diferencia de peso de los microcosmos: $P1-P2=$ cantidad de agua a suplementar cada día en el invernadero para recuperar el 60 % deseado de la capacidad de campo del suelo en los microcosmos.

Una vez asignados los microcosmos a los grupos control y experimentales (Figura 3), se extrajeron los protozoos, de tres microcosmos del control (S), y 3 del suelo con petróleo (SP) tomados aleatoriamente. Los microcosmos se desecharon una vez tomadas las muestras y realizados todos los análisis físicos, químicos y biológicos. Este primer muestreo correspondió al tiempo cero. Solo se procesaron 3 microcosmos de (S) y 3 de (SP) debido a que en este tiempo solo había semillas de *M. sativa* y, por tanto, no había efecto de planta alguna sobre la microbiota.

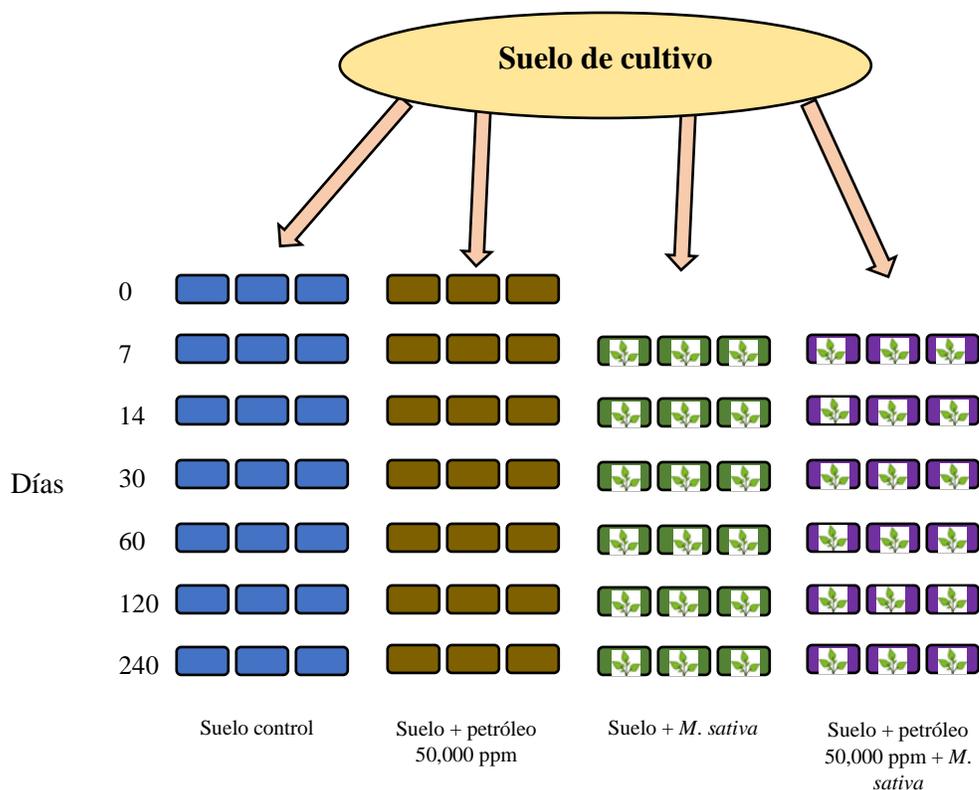


Figura 3. Diseño del experimento. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días

Se programaron muestreos a los 0, 7, 14, 30, 60, 120 y 240 días para explorar el desarrollo de la comunidad de protozoos y bacterias en el corto plazo, que fueron los primeros 30 días, y a largo plazo después de los 30 días. La duplicación del tiempo entre muestreos se basó en la observación del desarrollo no lineal de la comunidad de protozoos con respecto al tiempo (Bamforth 1992), por lo que este espaciamiento de los muestreos ayudó a una mejor exploración de los cambios operados en la comunidad de protozoos como consecuencia de la exposición al petróleo y al establecimiento de la planta en el suelo contaminado.

Contaminación de suelo

El petróleo fue agregado al suelo gradualmente y se revolvió mecánicamente hasta tener una mezcla homogénea de 50g/kg. Esta mezcla se dejó evaporar por 24 h y posteriormente se llevó a 60 % de la capacidad de campo del suelo con agua destilada estéril.

Determinación de la riqueza de especies de protozoos

Se realizó una curva de acumulación de especies para determinar el volumen de suelo que permitiera comparar la mayor proporción de las comunidades de ciliados y flagelados de los microcosmos con mayor nivel de confianza. Se procesaron consecutivamente, 10 muestras de 10g de suelo para obtener la frecuencia de aparición de cada especie presente en 100 g de suelo. Después se corrió el algoritmo de rarefacción del PC-Ord © (ver. 6 para Windows ©), mediante este análisis se estableció un tamaño de muestra de 40 g por cada microcosmos que permite tener representado el 80 % de las comunidades de ciliados y flagelados (Figura 4). Los 40 g se procesaron en 4 tandas de 10 g.

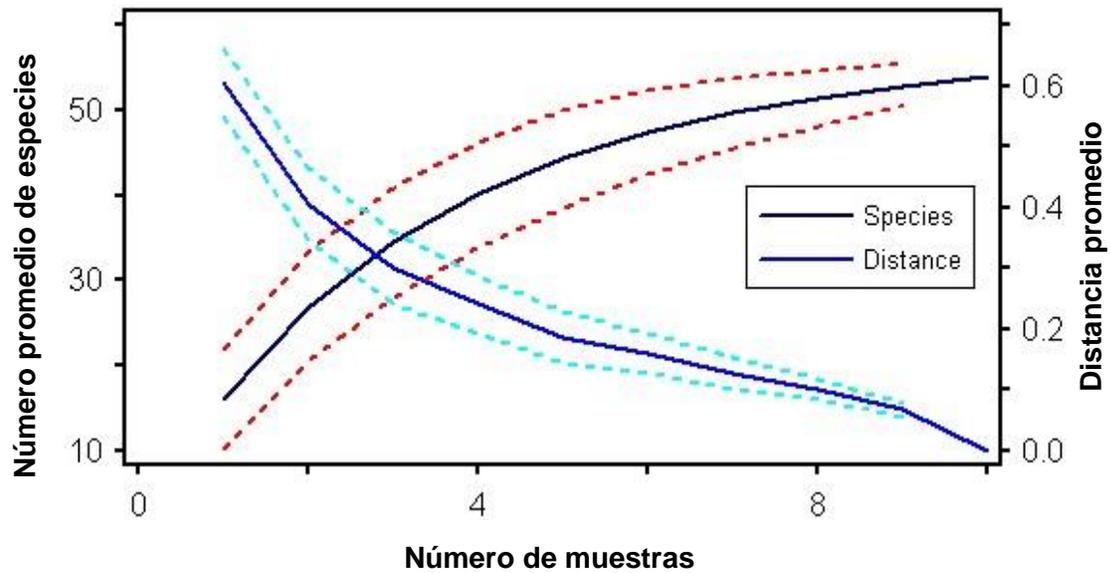


Figura 4. Curva de acumulación de especies de ciliados y flagelados. Se usó el algoritmo de rarefacción en PC-ORD © (ver. 6 para Windows ©) para calcular el volumen de suelo apropiado para muestrear la mayoría de las comunidades de ciliados y flagelados antes de la contaminación del suelo con petróleo. La curva logarítmica normal es la proyección teórica del aumento de la riqueza de especies en función del aumento del volumen del suelo, y la línea de puntos superior e inferior indica la varianza de las especies. La línea hiperbólica representa las especies que aún faltan para lograr el 100% del censo de especies, y las líneas punteadas denotan el nivel de incertidumbre (Cortés-Pérez et al. 2018). Con base en este análisis, 40 g de suelo fue el tamaño de muestra óptimo para obtener alrededor del 80 % de las especies en el microcosmos

Para la extracción de ciliados y flagelados se colocaron 10 g de suelo en una caja Petri a la que se le agregaron 10 ml de agua destilada, pasados 10 min, se filtró el agua en papel filtro del #2 y se centrifugó a 755g durante 5 min (observación personal). Después se identificaron los ciliados y flagelados en un microscopio de contraste de fases y se registró la aparición de cada tipo morfológico. Todos los microcosmos fueron revisados el mismo día que se extrajeron, por lo que representan la fracción de ciliados y flagelados activos en el suelo al momento del muestreo. Los ciliados y flagelados se observaron con aumentos desde 100 - 1000 × en microscopio de contraste de fases. También, se les tomaron videos de sus movimientos para complementar y corroborar su identificación, para ello se utilizaron claves taxonómicas basadas en sus características morfológicas (Foissner y Berger 1996; Jeuck y Arndt 2013; Lee et al. 2000; Patterson 1996). La identificación morfológica de las especies ayudó a determinar los grupos tróficos de ciliados y flagelados de acuerdo con sus hábitos alimenticios reportados en la literatura. Estos se agruparon en las siguientes preferencias: bacterívoros (B), osmotróficos (Os), omnívoros (O), los que se alimentan de otros protozoos (D), autótrofos (Au), fungívoros-bacterívoros (F, B), y los que se alimentan de algas (Al).

Cuantificación de bacterias cultivables

Las bacterias se cuantificaron usando el método de dilución en placa en agar extracto de suelo, para lo cual se utilizó 1 g de suelo de cada microcosmos y se homogenizó en 9 mL de agua destilada por un minuto en vortex y se dejó reposar durante 5 min, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10^{-4} . De esta dilución se tomó una alícuota de 0.1 mL que se dispersó sobre la caja Petri con agar extracto de suelo. Este procedimiento se realizó por

triplicado. Las cajas de Petri se incubaron a 28° C durante 7 días y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo en peso seco (UFC/g).

Análisis molecular

Extracción de ADN del suelo

Se tomaron 0.25 g de suelo de cada uno de los microcosmos para extraer el ADN total del suelo de cada tratamiento. Para lo anterior, se utilizó el kit de extracción *PowerSoil® DNA Isolation Kit* (Mobio). Posteriormente, a las extracciones se corrió una electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Después se hicieron amplificaciones de la fracción 18S rRNA con oligonucleótidos específicos para ciliados. Para las bacterias se utilizaron oligonucleótidos universales para 16S rRNA (ver Tabla 1).

Amplificación por PCR

Para todas las amplificaciones se utilizó un termociclador automatizado (T100™ ThermalCycler - Bio-Rad). Las condiciones de amplificación por PCR para las bacterias y para los ciliados fueron las siguientes:

Bacterias: La PCR fue llevada a cabo en un volumen de 50 µl conteniendo 1 µM de cada primer (GM3F y GM4R), 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas), 1 X PCR buffer y 50 ng de ADN. Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 20 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C 1 min, 72°C 45 s, bajando 1°C cada 2 ciclos; 10 ciclos a 94°C por 45 s, 40°C 1 min, 72°C 45 s; extensión final a 72°C por 7 min. Los productos obtenidos de esta PCR se utilizaron como molde para hacer amplificaciones anidadas con los primers GM5F-GC y 907R, para así obtener un fragmento de aproximadamente 500 a 600pb, las condiciones de esta segunda PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 20

ciclos a 94°C por 45 s, 70°C 1 min, 72°C 45 s, bajando 1°C cada 2 ciclos; 10 ciclos a 94°C por 45 s, 60°C 1 min, 72°C 45 s; extensión final a 72°C por 7 min.

Ciliados: La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µl conteniendo 0.2 µM de cada primer (CilF y CilR I), 0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 1.25 U de Taq polimerasa (Fermentas), 3.6 mg [ml]⁻¹ de albumina (BSA), 1 X PCR buffer y 50 ng de ADN. Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 26 ciclos a 94°C por 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min, extensión final a 72°C por 10 min. Los productos obtenidos se utilizaron como molde para hacer amplificaciones anidadas con los primers CilF^a y CilR I, y así obtener fragmentos de 600 pb.

Cultivo de *Colpoda* sp.

De los mesocosmos con petróleo se cultivó el ciliado *Colpoda* sp. el cual se le extrajo el ADN, también se amplificó el ADN, y se realizó una PCR anidada con los primers para los ciliados ya mencionados.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Gen	Especificidad	Primer	Secuencia (5-3´)
16S	Universal	GM3F GM4R GM5F-GC 907R	AGAGTTTGATCMTGGC TACCTTGTTACGACTT CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCT ACGGGAGGCAGCAG CCGTCAATTCCTTTRAGTTT
18S	Ciliados	CilF CilR I CilF ^a	TGG TAG TGT ATT GGA CWA CCA TCT GAT CGT CTT TGA TCC CTT A CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGTG G TAG TGT ATT GGA CWA CCA

^a-La secuencia GC de la grapa CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Para la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (DGGE) se utilizaron los amplicones de bacterias (16S), de ciliados (18S) y del ciliado *Colpoda* sp. Los DGGE se realizaron utilizando el sistema de electroforesis D-código (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Los productos de PCR se cargaron directamente en un gel de acrilamida al 6 % (w:v) (acrilamida-bisacrilamida 37,5: 1) con un gradiente desnaturizante 30 % a 60 % para las bacterias. Para los ciliados, el gradiente desnaturizante fue 20 a 42 %. Se utilizó buffer TAE 1X para la electroforesis, la cual se realizó a 60 ° C y 60 V durante 16 h. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio por 30 min, y se visualizaron en un transiluminador de UV.

Secuencias

Las bandas detectadas en los geles se cortaron, se colocaron en tubos de 0.6 mL con 10µL de agua (grado biología molecular) para extraer el ADN. El ADN recuperado de las bandas se amplificó, para las bacterias se utilizaron los primers GM5F y 907R. Para los ciliados se utilizaron los primers CilF y CilR I. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1 %, se limpiaron con el Kit de limpieza *Ultraclean*® Kit (Mobio) para su posterior secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos NCBI utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLASTn), y aquellas con mayor similitud se asignaron a nivel del género correspondiente.

Análisis de datos moleculares

Los geles de DGGE se fotodocumentaron, y los patrones de bandas de las imágenes de los DGGE se analizaron y compararon con el software PyElph 1.4 (Pavel y Vasile 2012), de este análisis se generó una matriz de presencias y ausencias, la cual fue analizada en el programa

PC-ORD © ver. 6 para Windows ©, para obtener los dendogramas de similitud de los geles de DGGE tanto de la comunidad de bacterias como de ciliados.

Se calcularon los índices de riqueza ponderada por rango (Rr), que proporcionan una estimación de diversidad de los geles de DGGE: $Rr = (N^2 \times D_g)$ donde N representa el número total de bandas del patrón, y D_g el gradiente desnaturalizante comprendido entre la primera y la última banda del patrón, según lo descrito por Marzorati et al. (2008). Además, se realizó el análisis de ventana corrediza (MWA- Moving Windows Analysis) para ver la dinámica de las comunidades de bacterias y ciliados a lo largo de los 240 día (Marzorati et al., 2008). Para lo cual se utilizó la matriz de similitud de los geles de DGGE para calcular el coeficiente de correlación de Pearson, con este se calculó la tasa de cambio (Δ_t) de la comunidad microbiana. El parámetro de tasa de cambio (Δ_t) promedia el grado de cambio entre perfiles de DGGE consecutivos de la misma comunidad durante un intervalo de tiempo (Marzorati et al. 2008).

Para la construcción de los árboles filogenéticos las secuencias se alinearon con la herramienta MUSCLE, las distancias evolutivas se calcularon usando el método Neighbor-joining y la construcción de los árboles se realizaron en el programa MEGA versión X (Kumar et al. 2018).

Biomasa de *Medicago sativa*

La biomasa total de *M. sativa* en peso seco se evaluó en los días 7, 14 y 30 esto debido a que durante los primero 30 días las raíces y tallos fueron muy pequeños en todos los tratamientos. Después de 60 y hasta los 240 días se evaluó la biomasa en peso seco de tallos, raíces y hojas.

Después de procesar el suelo de los tratamientos con *M. sativa*, las raíces se lavaron con agua para quitar el suelo adherido a ellas, y el exceso de agua se quitó con papel absorbente. La planta se colocó en horno a 65 ° C durante 48 h, y se registró el peso seco (Chigbo et al. 2013).

Determinación de materia orgánica, nitrato, amonio y fósforo disponible

La materia orgánica total se cuantificó mediante oxidación con dicromato de potasio (método de Walkley y Black) (Nelson y Sommers 1982). Las concentraciones de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) extraíbles se determinaron por espectrofotometría (UV/vis) a partir de extractos de suelo realizados con KCl 2M. El NH_4^+ se registró a 660 nm y el NO_3^- a 410 nm (Foster 1995). El pH del suelo se midió con un pHmetro en una solución suelo:agua con relación 1:2.5. La cuantificación de fósforo disponible en suelo se realizó por el método de Bray y Kurtz (1945).

Análisis de los hidrocarburos (C12 a C26) mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS)

La extracción de hidrocarburos se realizó por duplicado de cada una de las muestras de suelo al finalizar cada periodo experimental. Se pesó 1 g de muestra y se adicionaron 2 mL de hexano grado HPLC, se mantuvo en agitación durante 30 min, se separó la fase orgánica y esto se repitió tres veces. El extracto hexánico fue secado con NaSO_4 anhidro y fue filtrado, se evaporó en rotavapor a presión reducida, para su posterior inyección al cromatógrafo de gases.

Para el análisis de GC-MS se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N (Net Work GC system), equipado con una columna DB-5, 5%-fenil-

metilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 50 ° C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280 ° C usando una rampa de calentamiento de 20 °C/min y se mantuvo durante 20 min. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue de 250 ° C, inyección 30plit, con una relación de 30plit de 15:1. Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada uno de los picos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d), además de la comparación con un estándar (Saturated Alkanes, C7-C3, #49451-U Sigma-Aldrich) analizado bajo las mismas condiciones, para cuantificar los hidrocarburos. Los hidrocarburos totales se obtuvieron de la suma de todos los compuestos que se cuantificaron.

Análisis estadístico y cálculos

Se realizó un análisis de varianza para cada variable (materia orgánica, nitrato, amonio, fósforo disponible e hidrocarburos) y la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$). La riqueza de especies y sus abundancias fueron comparadas mediante chi-cuadrada. El índice de similitud de Sørensen se calculó con base en la abundancia de especies utilizando el software PC-ORD © ver. 6 para Windows ©. Se calcularon los índices de diversidad de Shannon (H') y Simpson ($1/D$).

$$\text{Shannon (H')} \quad H = -\sum p_i \times \ln(p_i)$$

donde p_i es la proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos, \ln es el logaritmo natural.

$$\text{Simpson} \quad D = \frac{\sum n_i(n_i-1)}{N(N-1)}$$

donde n_i es el número de organismos que pertenecen a la especie i y N el número total de organismos.

También, se realizó un análisis de correlación canónica (CCA) entre los parámetros realizados y la comunidad de ciliados y flagelados, el cual se hizo con el software PC-ORD © ver. 6 para Windows ©.

RESULTADOS

Parámetros del suelo

El contenido de materia orgánica del suelo fue alto en los microcosmos sin petróleo (S y SM), en ambos tratamientos los valores fueron muy similares entre sí durante los 240 días (7.99 a 9.93). En los microcosmos con petróleo (SP y SPM) el contenido de M. O. incrementó el doble que en los microcosmos sin petróleo (14.29 a 16.37) (Figura 5).

El contenido de nitrato en los microcosmos S y SM fue significativamente mayor ($P < 0.01$) que en los tratamientos con petróleo. En estos microcosmos la concentración de nitrato incrementó a través de los 30 días, comenzó a disminuir a partir del día 60 hasta los 240 días en donde hubo una disminución significativa en ambos tratamientos. Por otro lado, la concentración de nitrato fue muy similar en los microcosmos con petróleo (SP y SPM) durante los 240 días (Figura 5). El amonio no mostró un patrón claro de cambio durante los 240 días, los microcosmos de suelo control y suelo con petróleo presentaron las concentraciones más altas en el tiempo 0, y las concentraciones fueron significativamente más bajas en los siguientes 30 días que en el resto de los tratamientos (Figura 5). Los niveles de amonio aumentaron en todos los microcosmos a los 60 y 120 días, pero disminuyeron significativamente después del día 240, salvo en el suelo con petróleo SP240.

Los tratamientos sin petróleo (S y SM) mostraron mayor concentración de fósforo, la cual tuvo poca variación durante los 240 días. En los microcosmos con petróleo (SP y SPM) la concentración de P fue significativamente más baja que en los tratamientos sin contaminación, y mostraron valores similares durante los 240 días (Figura 5).

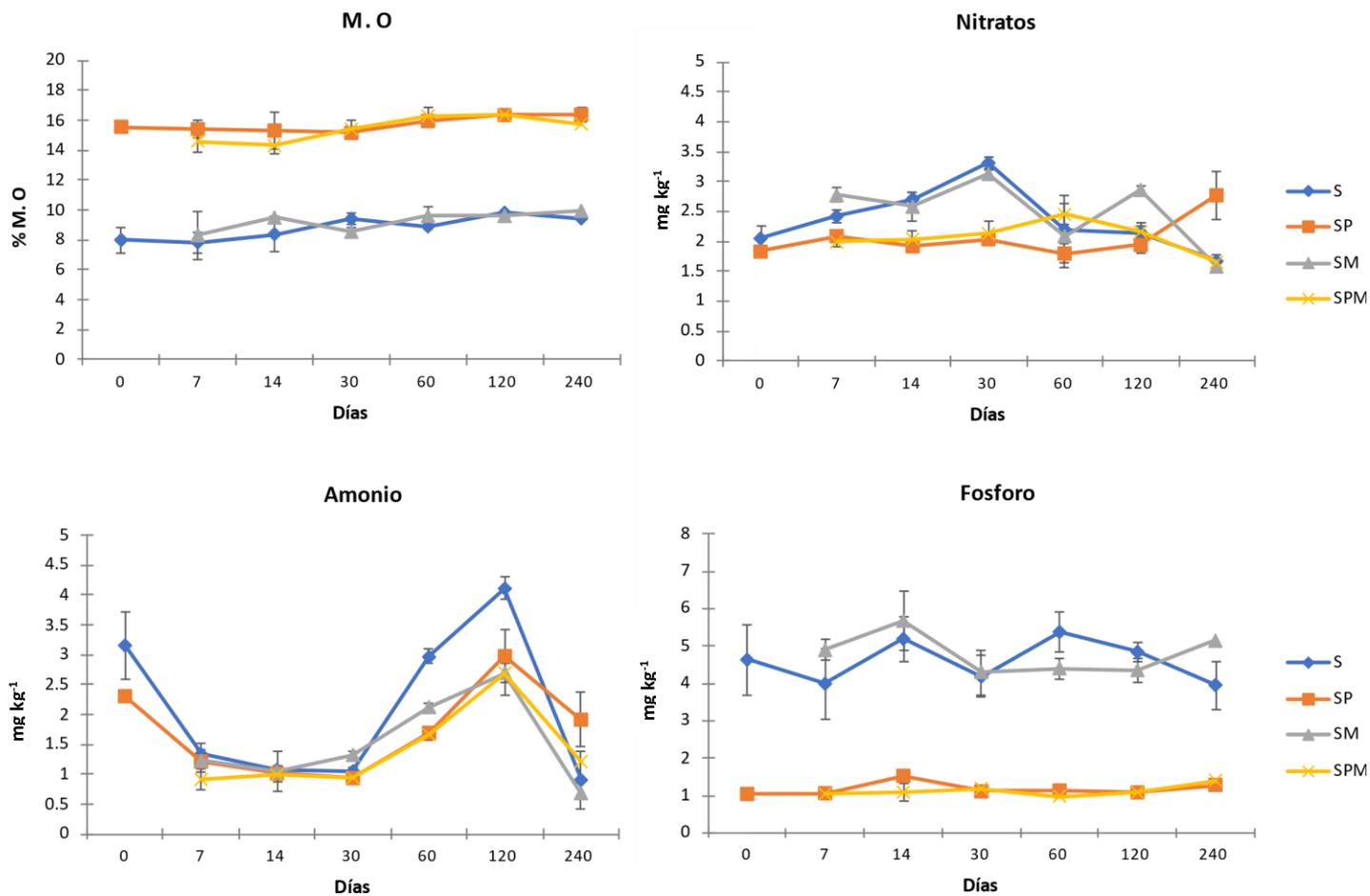


Figura 5. Parámetros del suelo Materia Orgánica (M.O), Nitrato, Amonio y Fósforo. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Las líneas de desviación estándar se muestran en la parte superior de las barras, cada barra representa la media de 3 réplicas

Hidrocarburos totales

Se produjo una mayor degradación de hidrocarburos totales en los microcosmos con *M. sativa* (95%) que en los microcosmos SP (81%) después de 240 días. Después de 7 días los tratamientos con petróleo tuvieron una disminución del 45% en SPM y 41% en los tratamientos SP. Sin embargo, en los días 30, 60 y 120 hubo fluctuaciones, aumentando y disminuyendo la concentración de hidrocarburos totales en ambos tratamientos (SP y SPM) (Figura 6).

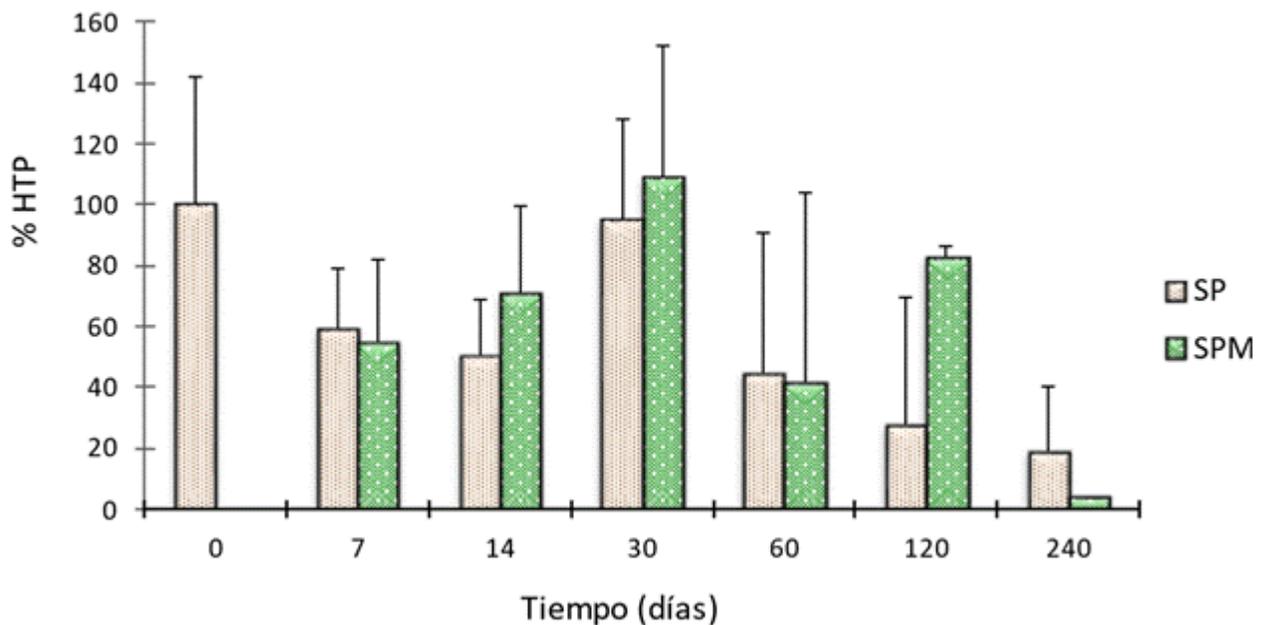


Figura 6. Hidrocarburos totales del petróleo TPH. Suelo contaminado (SP); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240. Las líneas de desviación estándar se muestran en la parte superior de las barras, cada barra representa la media de 3 réplicas

Los hidrocarburos identificados en los tratamientos SP y SPM fueron compuestos de 12 a 26 carbonos (C12-C26). En el tratamiento con SPM, todos los compuestos se redujeron significativamente después del séptimo día ($P < 0.01$), mientras que en el tratamiento SP sólo los compuestos C14 a C22 tuvieron una reducción significativa ($P < 0.01$) después de 7 días. Sin embargo, los compuestos de C15 a C26 aumentaron sus cantidades significativamente en el día 30 en ambos tratamientos. Después de 60 días, todos los compuestos tuvieron una reducción significativa respecto al día 30 y en el día 120 nuevamente incrementaron (Figura 7).

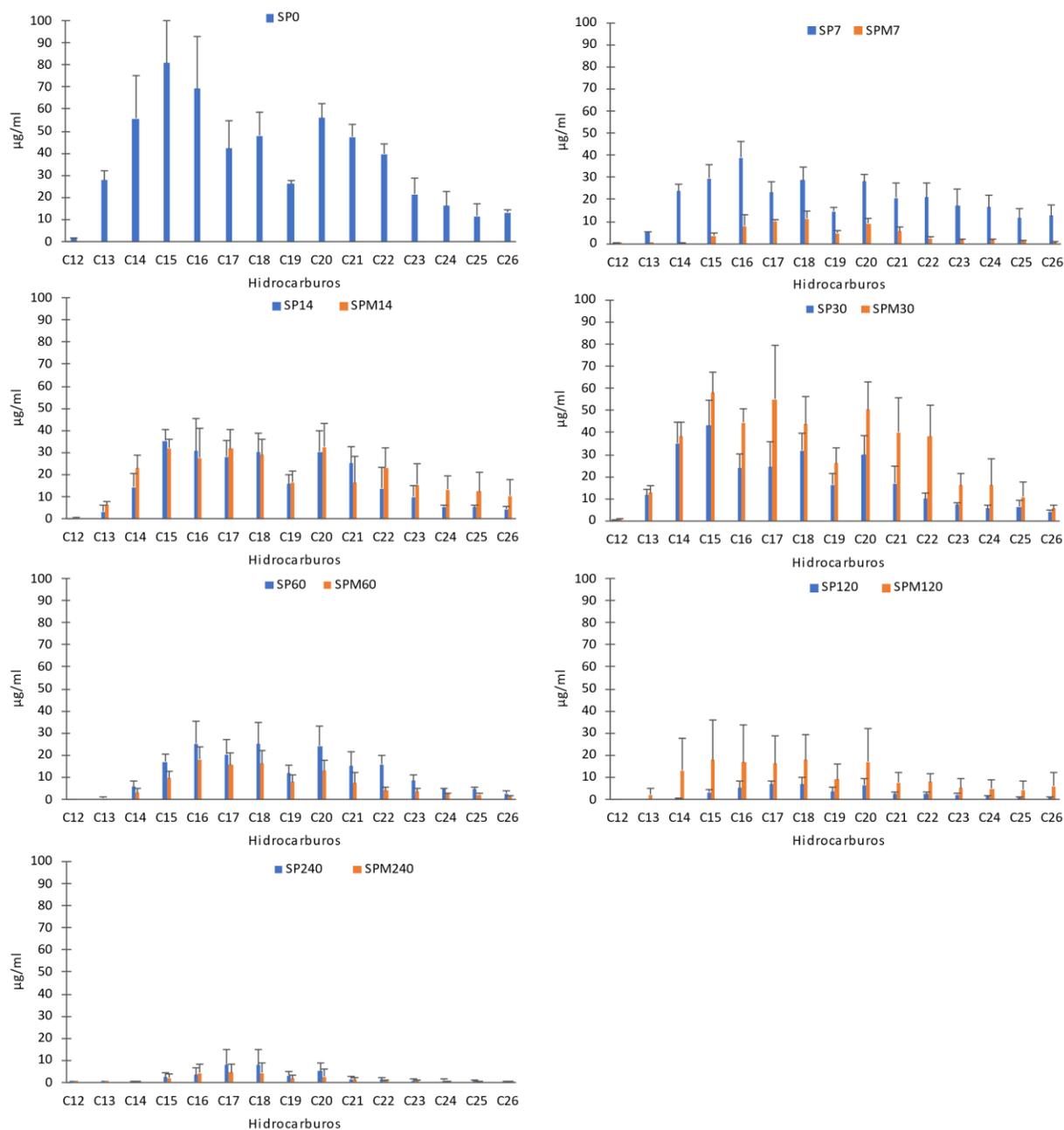


Figura 7. Concentraciones de hidrocarburos en los microcosmos. Suelo contaminado (SP); Suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Las líneas de desviación estándar se muestran en la parte superior de las barras, cada barra representa la media de 3 réplicas. Hidrocarburos: dodecano (C12), tridecano (C13), tetradecano (C14), pentadecano (C15), hexadecano (C16), heptadecano (C17), octadecano (C18), nonadecano (C19), eicosano (C20), heneicosano (C21), docosano (C22),tricosano (C23), tetracosano (C24), pentacosano (C25) y hexacosano (C26)

Biomasa de *Medicago sativa*

Durante el estudio, se incrementó la biomasa de las plantas tanto en los tratamientos no contaminados como en los contaminados. En ambos tratamientos las plantas de *M. sativa* incrementaron su tamaño continuamente durante los 240 días. Sin embargo, en las plantas crecidas en suelo con petróleo el crecimiento fue menor que el de las plantas en el suelo libre de petróleo. Durante los primeros 30 días, las plántulas fueron muy pequeñas por lo que la biomasa no se dividió en tallo, raíz y hojas, sino que se pesó la biomasa total. A partir del día 30 la biomasa en los tratamientos sin petróleo incrementó significativamente ($P < 0.01$) casi al doble (Figura 8A). Del día 60 al 240, se cuantificó la biomasa de hojas, tallos y raíces, las cuales fueron mucho más grandes en los tratamientos sin petróleo. En cuanto a los tratamientos con petróleo, las raíces fueron las que incrementaron más su biomasa del día 60 a 240 (Figura 8B).

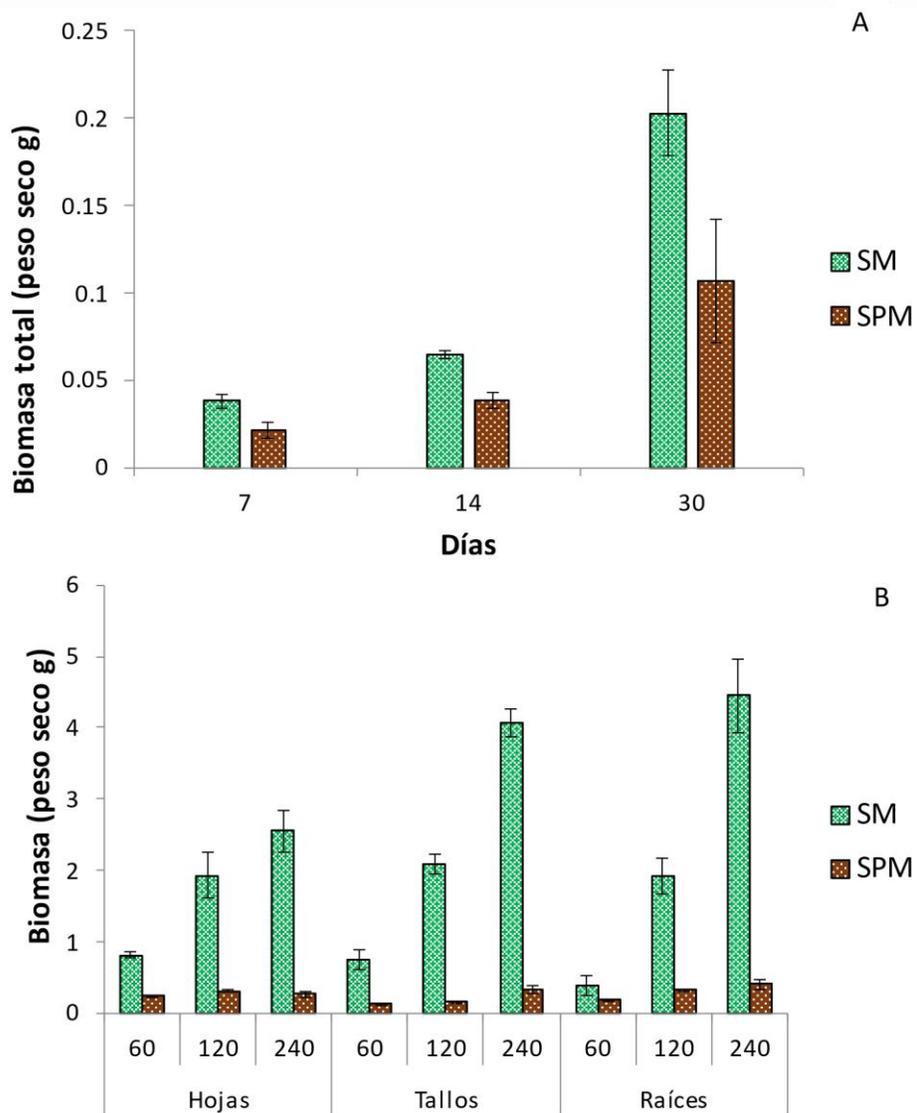


Figura 8. Biomasa total de *Medicago sativa*. Cada barra representa la media de 3 réplicas con error estándar. A) Biomasa total peso seco. B) Biomasa peso seco de Raíces (R), Tallos (T) y Hojas (H). Suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.

Cabe recalcar que las plantas de los tratamientos con petróleo después de 30 días empezaron a tornarse amarillentas, además de que las raíces fueron más gruesas respecto a las que crecieron en suelo libre de petróleo; además, se observaron nódulos en raíces de plantas en los microcosmos sin petróleo en el día 30, y en los microcosmos con petróleo se observaron hasta los 60 días (Figura 9).

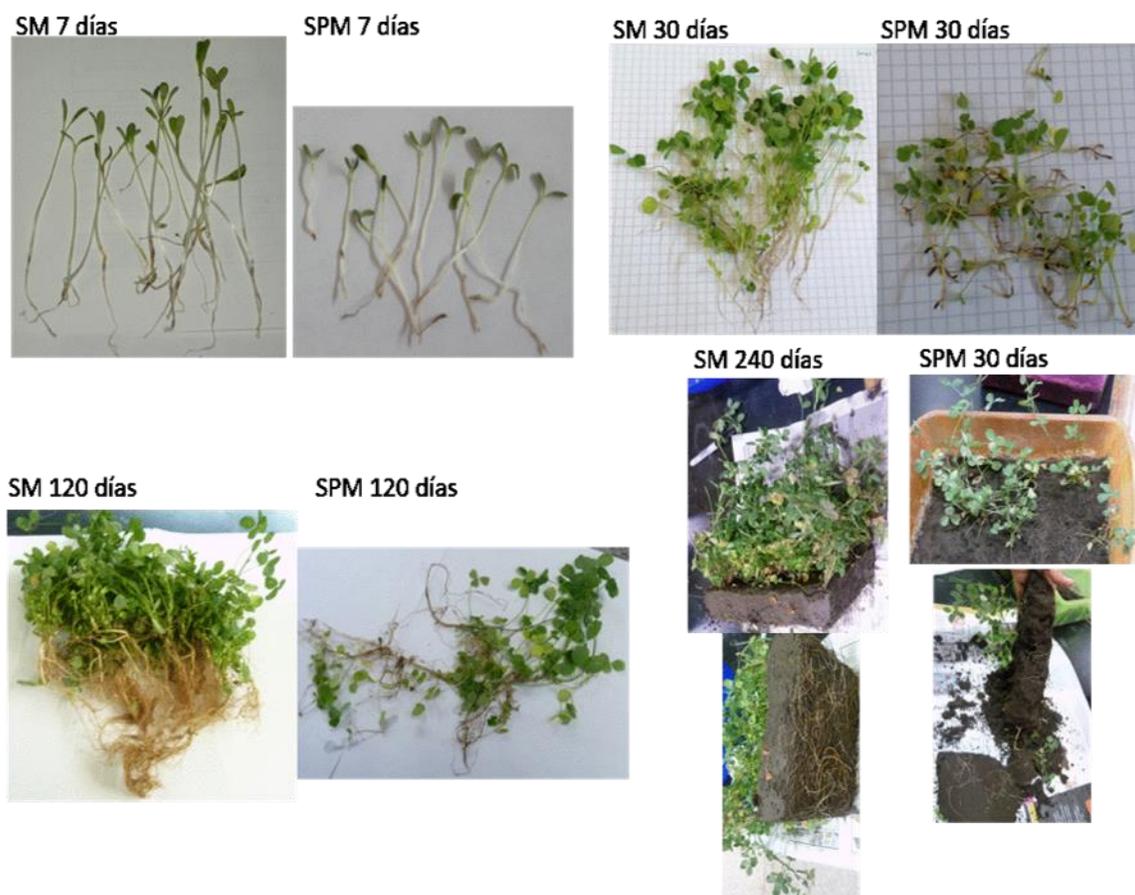


Figura 9. *Medicago sativa* en diferentes días. Suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.

Estructura de la comunidad de ciliados y flagelados

Se identificaron 91 especies de ciliados y flagelados durante todo el estudio, los cuales pertenecen a 58 géneros y 36 familias. Los flagelados con más abundancia fueron *Bodo*, *Cercomonas*, *Heteromita*, *Neobodo* y *Spumella*-like. Los ciliados con mayor frecuencia fueron *Colpoda*, *Cyrtolophosis*, *Tetrahymena* y *Trithigmotoma* (Tabla 2).

Solo 3 especies de protozoos sobrevivieron 24 h después del pulso de contaminación: *Colpoda steinii*, *Spumella dangerardii* y *Spumella socialis* (tiempo SP 0), mientras que en el suelo control (S) se encontraron 14 especies a las 24 horas (Figura 10A).

La riqueza de especies incrementó a través de los primeros días, en todos los tratamientos. La mayor riqueza de especies se alcanzó en el control a los 30 días, mientras que en los tratamientos suelo con petróleo (SP) y suelo con *M. sativa* (SM), el máximo número de especies se registró en el día 60. En cuanto al tratamiento suelo con petróleo y *M. sativa* (SPM) el número máximo de especies se registró en los 30 días y se mantuvo hasta al día 60 (Figura 10A). La abundancia de especies mostró una tendencia muy similar a la riqueza de especies en los tratamientos S, SM y SPM, en tanto que en SP la máxima abundancia de especies se encontró en el día 30 (Figura 10B). La abundancia de especies fue significativamente diferente ($P < 0.01$) entre el suelo control respecto a los tratamientos SP, SM y SPM. En el tratamiento control, la riqueza y abundancia de especies disminuyó después del día 60 (Figura 10B).

Los microcosmos del suelo control (S) acumularon 56 especies durante los 240 días, las cuales pertenecieron a 37 géneros. Estos microcosmos tuvieron la menor abundancia de especies donde *Bodo saltans*, *Colpoda steinii*, *Spumella cylindrica* y *Spumella dangeardii* fueron los flagelados y ciliados más abundantes.

Los microcosmos de suelo con petróleo (SP) presentaron 56 especies durante los 240 días, pertenecientes a 33 géneros, si bien acumularon la misma cantidad de especies que el control, tuvieron mayor abundancia de individuos por especie. Las especies más abundantes fueron *Neobodo caudatus*, *Cercomonas* sp1., *Colpoda cucullus*, *Colpoda inflata*, *Colpoda steinii*, *Heteromita* sp., *Protaspis gemmifera*, *Spumella cylindrica*, *Spumella dangeardii*, *Spumella socialis* y *Platyoprya* sp2.

Los microcosmos de suelo plantado (SM) acumularon la mayor riqueza de especies durante los 240 días. Las 68 especies detectadas en este tratamiento se agruparon en 46 géneros. Por

otro lado, *Neobodo caudatus*, *Colpoda cucullus*, *Colpoda steinii*, *Goniomonas truncata*, *Spumella cylindrica*, *Spumella dangeardii*, *Spumella socialis* y *Trithigmosoma* sp., fueron los más abundantes.

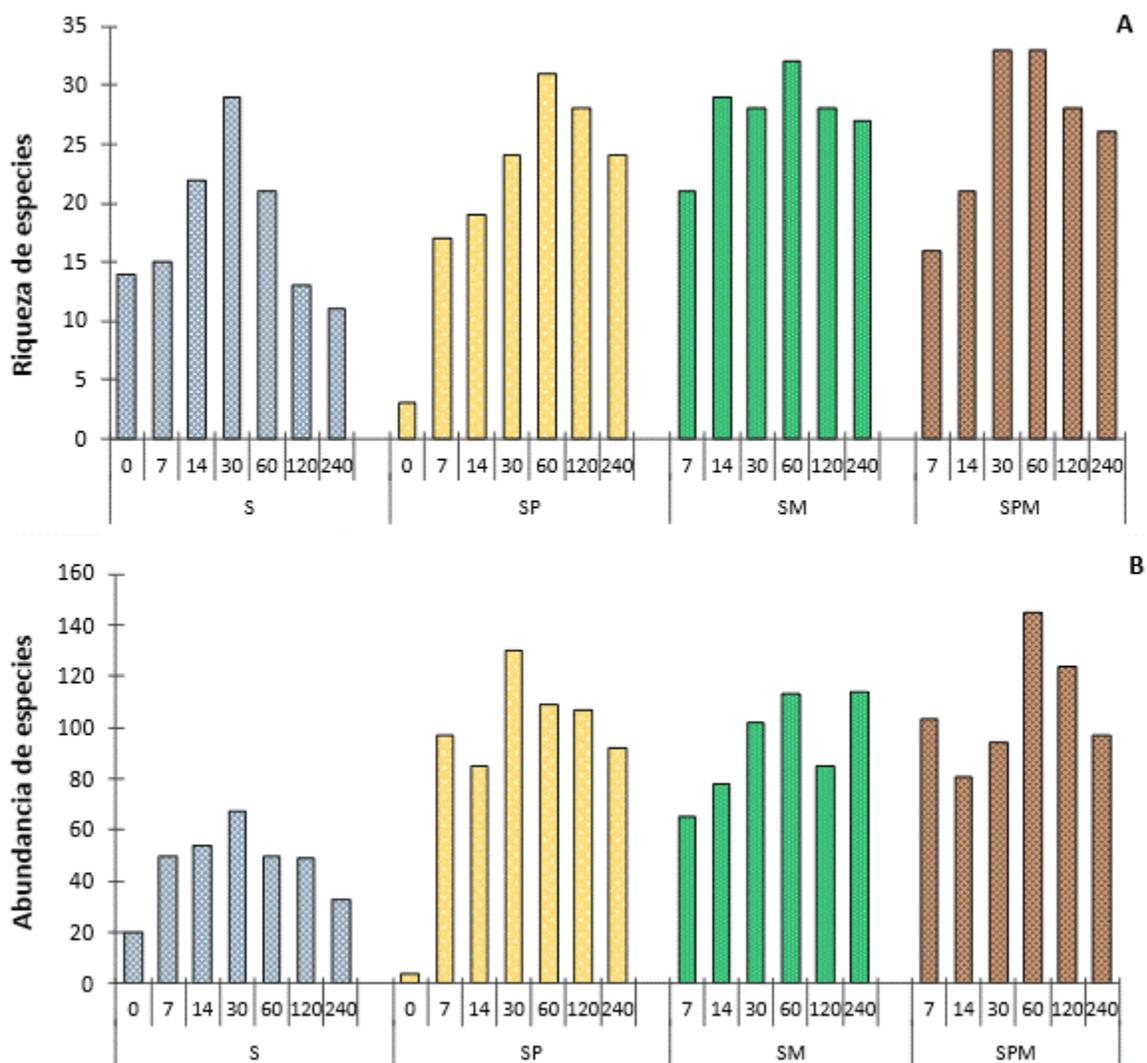


Figura 10 A) Riqueza de especies de ciliados y flagelados detectada en microcosmos a lo largo de 240 días. B) Abundancia de especies de ciliados y flagelados. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días

Los microcosmos de suelo contaminando plantado (SPM) fueron los segundos en riqueza de especies (64 especies) durante los 240 días, las cuales se agrupan en 38 géneros. Las especies más abundantes fueron *Neobodo caudatus*, *Cercomonas* sp1., *Colpoda cucullus*, *Colpoda inflata*, *Colpoda steinni*, *Spumella cylindrica*, *Spumella dangeardii*, y *Spumella socialis*.

Algunas especies se encontraron exclusivamente en los tratamientos sin petróleo (S y SM) como: *Amphisiella* sp., *Blepharisma* sp., *Coleps* sp., *Euplotes* sp., *Monosiga ovata*, *Phalansterium solitarium*, *Plagiopyla* sp. y *Urotricha* sp. En tanto que *Astylozoon* sp., *Metakinetoplastina* sp3., *Mastigamoeba* sp., *Protaspis gemmifera*, *Gonostomum* sp2. y *Tetrahymena* sp2. estuvieron presentes en los tratamientos con petróleo (SP y SPM). Además, las especies *Halteria* sp., *Leptopharynx* sp., *Cercomonas* sp5., *Gonostomum* sp1., *Trachelophyllum* sp. y *Trachelostyla* sp., solo se registraron en los tratamientos con planta (SM y SPM).

Los ciliados y flagelados con mayor abundancia en todos los microcosmos fueron *Bodo*, *Cercomonas*, *Colpoda*, *Neobodo* y *Spumella*-like, estos organismos dominaron en los microcosmos SP y SPM en los primeros 30 días, representando el 75 y 70% respectivamente; en contraste, en los microcosmos S y SM sólo representaron el 53 y 56 % de la comunidad, respectivamente. A partir del día 60, la abundancia de estos ciliados y flagelados disminuyó en los tratamientos con petróleo y representaron la mayor parte de la comunidad en el suelo control a partir del día 120 (Figura 11).

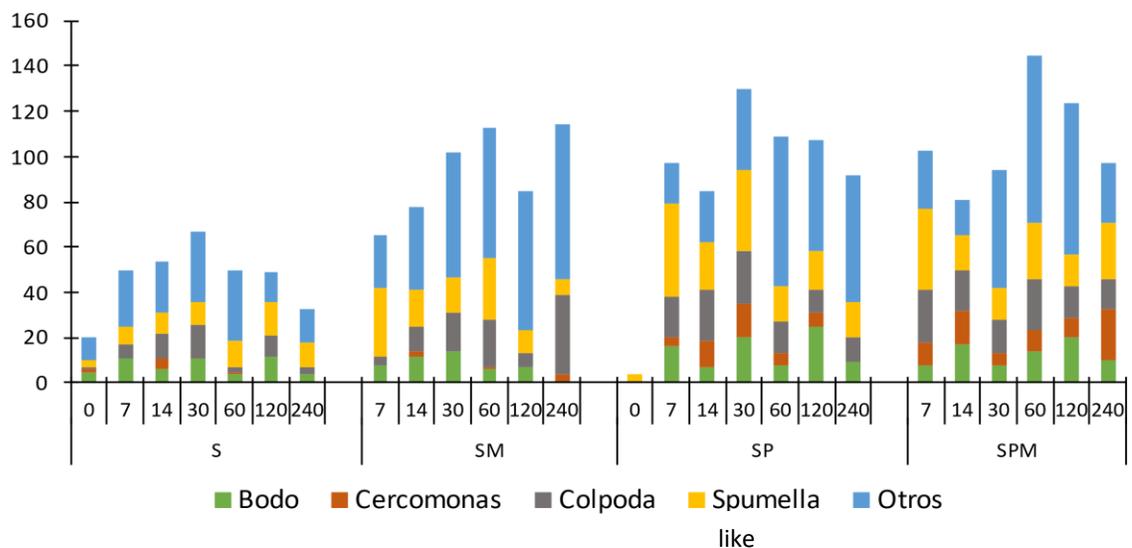


Figura 11. Géneros de ciliados y flagelados más comunes en todos los microcosmos. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días

Similitud entre las comunidades de ciliados y flagelados

El análisis de similitud de las comunidades de ciliados y flagelados muestra que los tratamientos con petróleo (SP y SPM) comparten 70% de similitud durante los 240 días; mientras que los tratamientos sin petróleo (S14, S30, SM14 y SM30) mostraron menor similitud (65%). En el resto de los tratamientos se observó una agrupación escalonada. La comunidad de ciliados y flagelados en S0 (suelo 24 h después de la instalación de los microcosmos) compartió menos del 20% de similitud con el resto de los tratamientos. El fuerte pulso de contaminación del petróleo provocó que SP0 (suelo + hidrocarburos 24 h después de la instalación de los microcosmos) mostrara una comunidad que se identificó como un grupo totalmente externo (Figura 12).

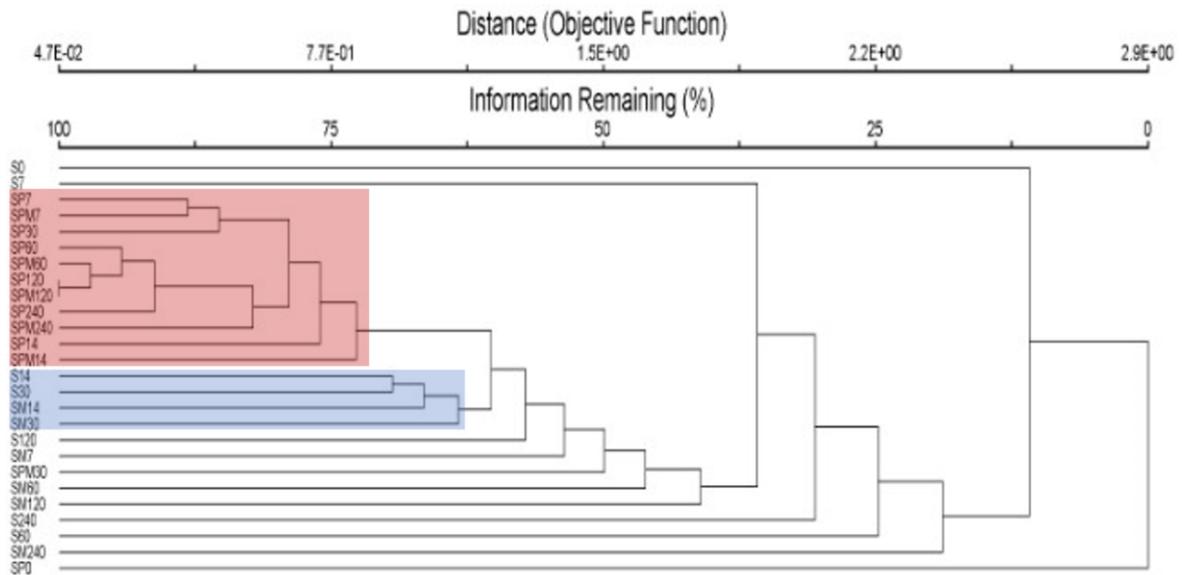


Figura 12. Análisis de similitud de la comunidad de ciliados y flagelados. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. En los rectángulos con color se muestra la agrupación de los tratamientos con más del 60% de similitud

Índices de diversidad

El índice de diversidad de Shannon (H') aumentó con el tiempo. En el momento 0, la diversidad fue apreciablemente mayor en el tratamiento de control que en el tratamiento de SP. Sin embargo, la diversidad se acercó a valores similares en todos los tratamientos a los 7, 14, 30 y 60 días, siendo el suelo con petróleo sembrado con *M. sativa* el más diverso, tanto a los 30 como a los 60 días ($H' = 3.31$). En el control (S) en los días 120 y 240, la diversidad disminuyó significativamente ($P < 0.01$) respecto al resto de los tratamientos SP, SM y SPM. El índice de diversidad de Simpson ($1 / D$) mostró valores crecientes de diversidad durante los primeros 30 días en los tratamientos sin petróleo (S y SM), a partir de los 60 días

disminuyeron significativamente, mientras que la diversidad en los tratamientos con petróleo (SP y SPM) mostró valores crecientes hasta los 60 días, posterior a eso la diversidad también disminuyó (Tabla 3).

Tabla 3. Índices de diversidad. Grupo control (S), suelo contaminado no plantado (SP); suelo plantado con *M. sativa* (SM) suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días.

Shannon							
Días	0	7	14	30	60	120	240
S	2.53	2.55	2.93	3.18	2.79	2.41	2.30
SP	1.04	2.67	2.75	3.01	3.21	3.06	3.03
SM		2.66	3.02	3.06	3.11	2.95	2.80
SPM		2.71	2.8	3.31	3.31	3.25	3.03
Simpson 1/D							
Días	0	7	14	30	60	120	240
S	11.11	11.26	16.38	20.50	13.16	18.09	9.15
SP	2.67	12.66	14.08	17.71	21.68	18.07	18.24
SM		13.16	21.12	21.49	18.39	14.17	13.56
SPM		13.37	14.51	23.38	23.81	24.33	17.39

Grupos tróficos

Se registraron 7 grupos tróficos en todo el estudio: bacterívoros (B), osmótrofos (Os), omnívoros (O), los que se alimentan de otros protozoos- depredadores (D), autótrofos (Au), fungívoros-bacterívoros (FB) y alguívoros (Al). Todos los grupos tróficos estuvieron representados por más de una especie. Los bacterívoros fueron los únicos con presencia en todos los tratamientos durante los 240 días, mostrando también la mayor riqueza de especies. La abundancia de bacterívoros fue más alta en los microcosmos SPM, seguida en orden descendente por SP, SM y S (Figura 13). Los microcosmos plantados con *M. sativa* (SPM y

SM) tuvieron mayor riqueza de bacterívoros. Dentro de este grupo trófico, los géneros más comunes fueron *Bodo*, *Cercomonas*, *Goniomonas*, *Monosiga*, *Neobodo*, *Spumella-like*, (flagelados), *Colpoda*, *Cyclidium*, *Cyrtolophosis* y *Tetrahymena* (ciliados).

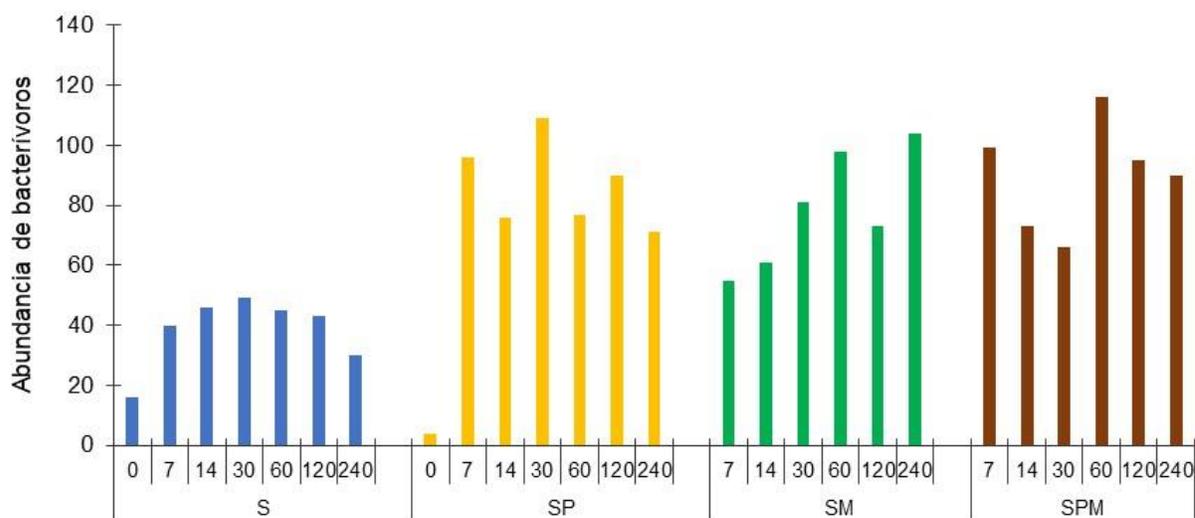


Figura 13. Abundancia de ciliados y flagelados bacterívoros. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días

El grupo osmótrofo (Os) estuvo representado por euglénidos del género *Astasia* y clorófitas del género *Polytoma*, hubo más frecuencia de estos géneros en los tratamientos con petróleo (SP y SPM). El grupo omnívoro (O) estuvieron presentes en los microcosmos sin petróleo después de 7 días mientras que en los microcosmos con petróleo estuvieron después de 14 días. Los omnívoros estuvieron representados por los géneros de ciliados *Astylozoon*, *Coleps*, *Euplotes*, *Holophrya*, *Uroleptus*, *Urostyla* y *Vorticella*. Los depredadores (D) estuvieron representados por los géneros de ciliados *Amphileptus*, *Blepharisma*, *Dileptus*, *Litonotus*,

Sphatidium y *Trachelophyllum* y euglénidos del género *Peranema*. Los depredadores fueron más comunes en los microcosmos SM durante todo el estudio. Los autótrofos (Au) estuvieron presentes en todos los microcosmos, pero fueron más frecuentes en los microcosmos SM, en los tratamientos SPM tuvieron presencia después de 30 días, los autótrofos estuvieron representados por los géneros de clorófitas *Chlamydomonas* y *Haematococcus*, además de euglénidos del género *Trachelomonas*. El grupo fungívoro-bacterívoro estuvo representado por ciliados del género *Platyoprya*, estuvieron presentes en todos los tratamientos, en los microcosmos contaminados (SP y SPM) aparecieron después de 14 días y fueron más abundantes que en los tratamientos libres de contaminación (S y SM). El grupo alguívoro (Al) estuvo representado por ciliados de los géneros *Trithigmostoma* y *Urotricha*, en los microcosmos sin contaminar S y SM fueron más abundantes. En los microcosmos con petróleo solo se encontró el género *Trithigmostoma*.

El impacto de la contaminación por petróleo sobre la estructura trófica de ciliados y flagelados fue fuerte en los primeros 30 días. A partir de que solo existían especies bacterívoras (SP) 24 h después de la contaminación, en los siguientes 7 días se detectaron osmótrofos y bacterívoros-fungívoros. Los osmótrofos y omnívoros fueron muy activos 2 semanas después del pulso de contaminación. El efecto de la planta sobre la estructura de grupos tróficos fue evidente al mostrar 5 de los 6 grupos tróficos después de 30 días de contaminación, en comparación con los microcosmos SP que tuvieron los mismos 3 grupos tróficos desde el día 14 al 30. Fue hasta el día 60 donde se presentaron los 6 grupos tróficos, incluso hubo más grupos tróficos que en los otros tratamientos a los 60 días (Figura 14). En los microcosmos sin petróleo (S y SM) hubo mayor número de grupos tróficos en los primeros 30 días, aunque disminuyó el número y la abundancia de los grupos tróficos en los

microcosmos S después de 60 días, a diferencia de los microcosmos SM en donde solo se redujo la abundancia de grupos tróficos, pero se mantuvo el número de individuos. Particularmente los alguívoros aparecieron desde el día 7 en el control, a partir del día 14 se presentaron en el SM, en el día 30 se encontraron en el SPM y finalmente, aparecieron en el tratamiento SP hasta el día 60.

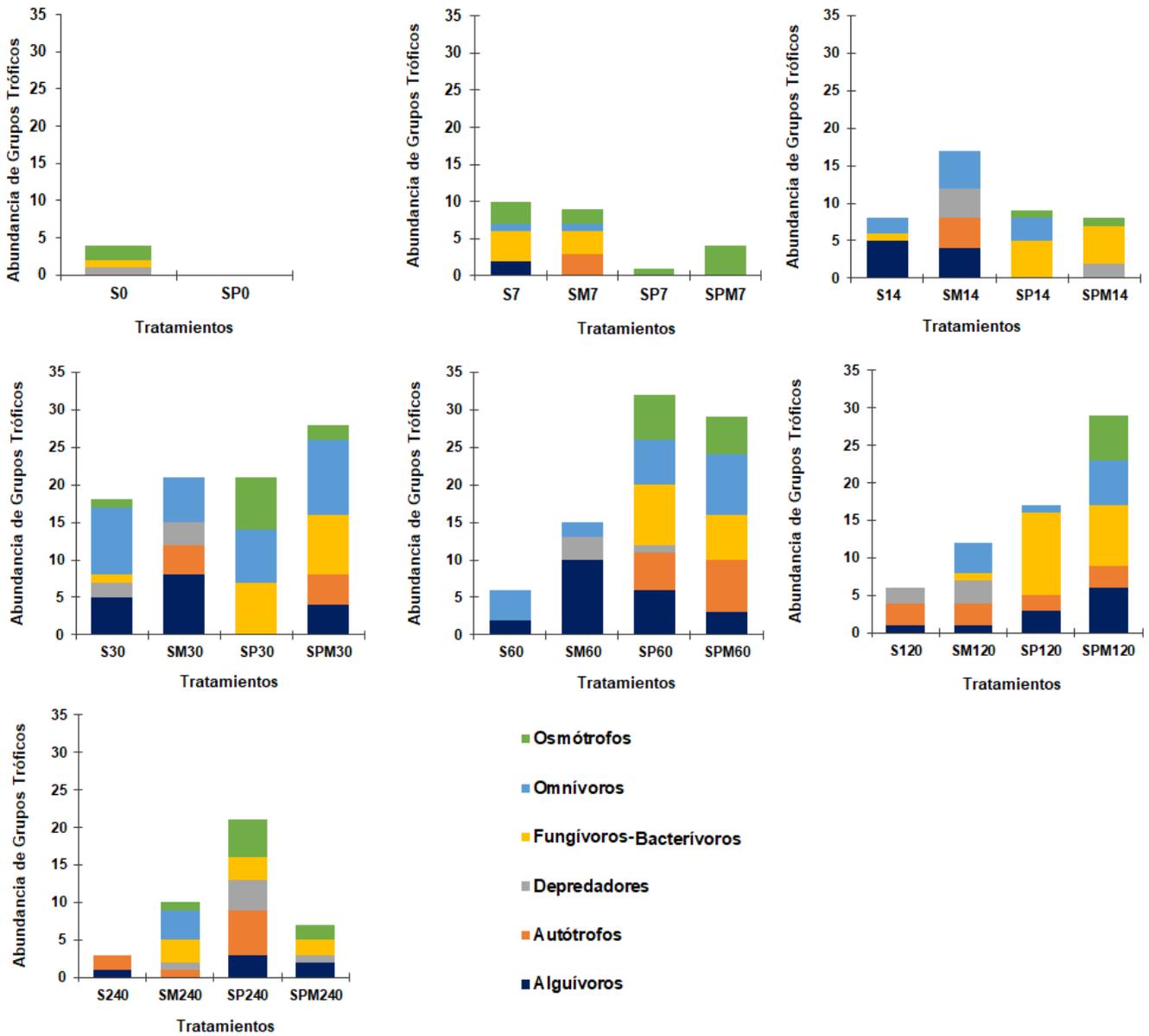


Figura 14. Abundancia de grupos tróficos de la comunidad de ciliados y flagelados detectados en los microcosmos durante 240 días. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. Osmótrofos, omnívoros, fungívoros-bacterívoros, depredadores, autótrofos y alguívoros

Número de Unidades formadoras de colonia de bacterias (UFC)

En el tiempo 0, la cantidad de unidades formadoras de colonias fue mayor en el suelo control en comparación con el tratamiento SP, siete días después hubo una disminución significativa ($P < 0.01$) en el número de UFC en el tratamiento SP en comparación con los demás tratamientos (Figura 15). Los números de UFC fueron muy similares entre los microcosmos sin petróleo S y SM. En comparación con los tratamientos con petróleo que en los primeros siete días arrojaron menores cantidades, pero después del día 30 se fueron recuperando y tuvieron un incremento significativo ($P < 0.01$) del número de UFC en el día 240 (Figura 15).

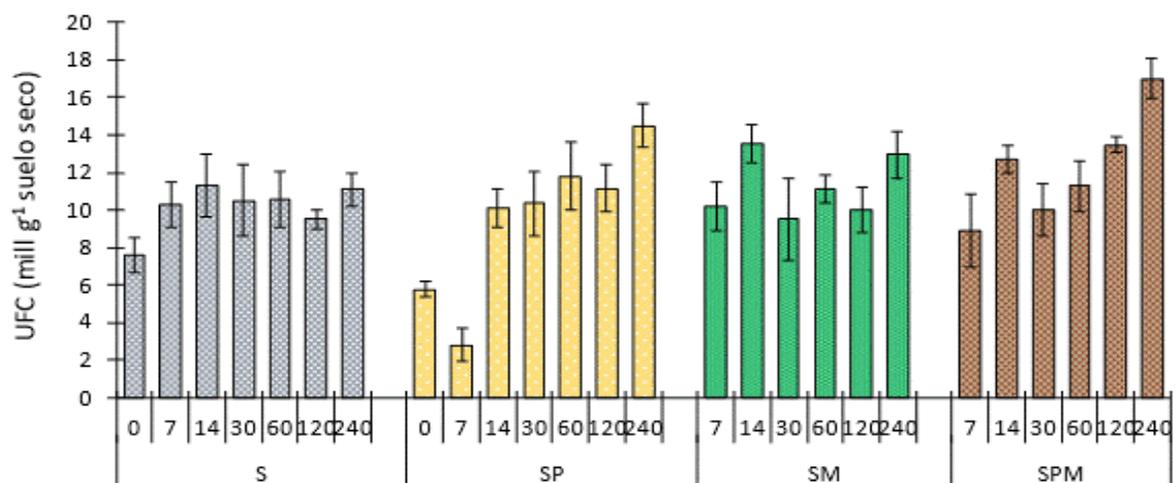


Figura 15. Número de unidades formadoras de colonia UFC por gramo de suelos. Cada barra representa la media de 3 réplicas con error estándar. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días

DGGE de la comunidad de bacterias y ciliados

Los perfiles de DGGE de bacterias presentaron patrones de bandas distintos, se encontraron un total de 57 bandas en todos los microcosmos, de las cuales solo 5 estuvieron presentes en todos los tratamientos. El dendograma de similitud de la comunidad de bacterias muestra dos agrupaciones, la primera con el 50% de parecido se agrupan los tratamientos SM y SPM de 7 días y S0. En la segunda agrupación con más de 50% de parecido, está la mayoría de los tratamientos del día 14 a 240 días (Figura 16).

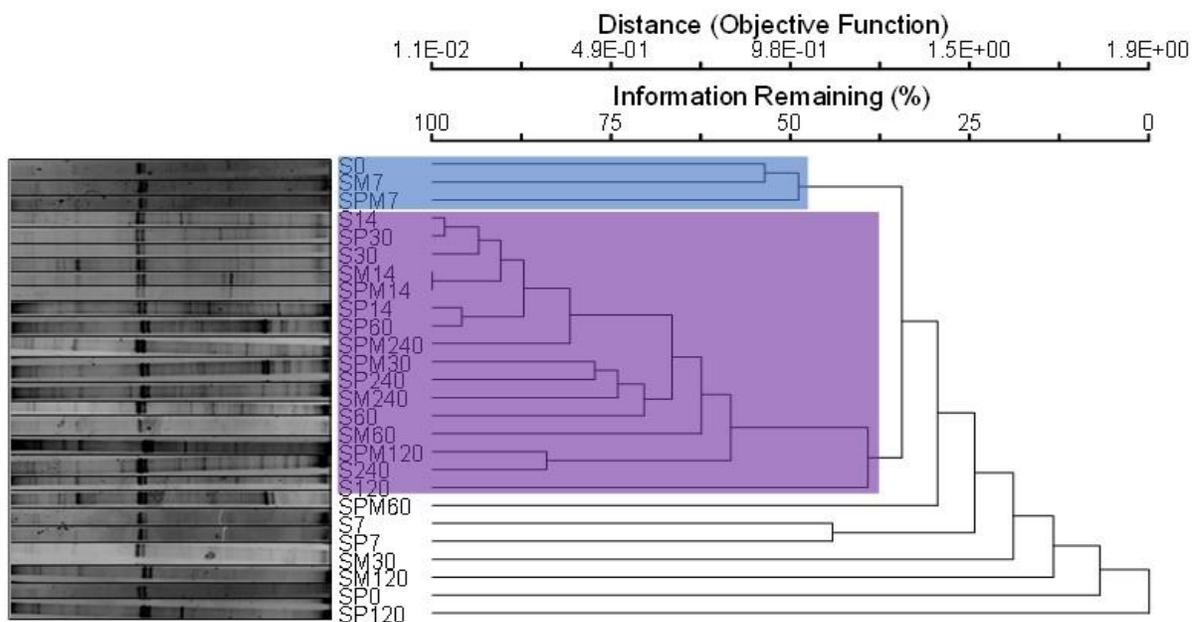


Figura 16. Perfiles de DGGE de la comunidad de bacterias. Análisis de similitud de presencia-ausencia de bandas de los perfiles de DGGE de la comunidad de bacterias. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. En los rectángulos con color se muestra la agrupación de los tratamientos con más del 50% de similitud

Con base en los rangos ponderados de riqueza (Rr) de las bandas de los geles de DGGE de la comunidad de bacterias todos los tratamientos durante los 240 días presentaron una diversidad de bacterias alta, debido a que los valores de Rr fueron superiores a 30 (Marzorati et al. 2008). A los 7 días, los valores de Rr fueron más bajos en los tratamientos con petróleo (SP y SPM) que en los tratamientos no contaminados (S y SM). Después de 14 días, los valores de Rr incrementaron significativamente ($P < 0.01$) en todos los tratamientos; a los 14 días, el tratamiento SPM presentó mayor diversidad de bacterias $Rr = 240$ (Tabla 4).

Días	0	7	14	30	60	120	240
S	66.15	48.6	194.4	144.15	194.4	135	126.15
SP	48.6	33.75	126.15	173.4	173.4	101.4	135
SM		79.35	216.6	101.4	93.75	93.75	126.15
SPM		66.15	240	173.4	135	109.35	163.35

En los perfiles de DGGE de ciliados se tuvieron patrones de bandas distintos en los diferentes tratamientos, se encontraron un total de 37 bandas y solo 2 bandas estuvieron presentes en todos los tratamientos. El dendograma de la comunidad de ciliados muestra cuatro agrupaciones, éstas se dieron por el tiempo, independientemente de los tratamientos, y se identifica la agrupación de los microcosmos de 0 a 7 días, 14 días, de 30 a 120, y de 240 días (Figura 17). La banda de los perfiles de DGGE que correspondió a *Colpoda* sp., coincidió con el patrón de banda del cultivo de *Colpoda* sp., el cual fue detectado en todos los perfiles de DGGE de todos los tratamientos.

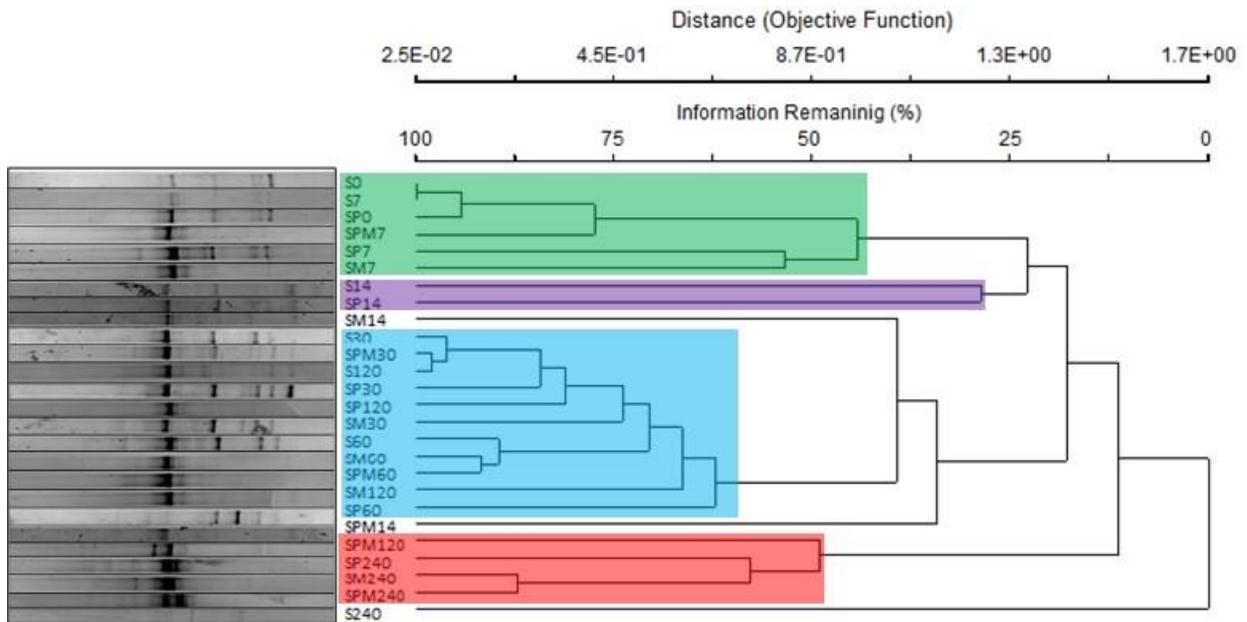


Figura 17. Perfiles de DGGE de la comunidad de ciliados. Análisis de similitud de presencia-ausencia de bandas de los perfiles de DGGE de la comunidad de ciliados. Grupo control (S); suelo contaminado (SP); suelo sembrado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días. En los rectángulos con color se muestra la agrupación de los tratamientos con más del 50% de similitud

La comunidad de ciliados en los microcosmos S y SM presentaron riqueza ponderada (Rr) de rango medio (valores intermedios entre 10 y 30) durante los 240 días, excepto en S a los 60 días que presentó valores altos de $Rr = 33.75$. Aunque en estos dos tratamientos la riqueza ponderada estuvo en rango medio, la riqueza en SM fue mayor a 25 en los días 30, 60 y 240. La comunidad de ciliados de los microcosmos contaminados SP tuvo valores intermedios de Rr, solo en el día 7 presento valores altos $Rr = 33.75$. Mientras que la comunidad de ciliados de los microcosmos SPM a los 30, 120 y 240 días mostró valores altos $Rr = 33.75$ (Tabla 5).

Tabla 5. Riqueza ponderada por rango (Rr) de ciliados. Grupo control (S), suelo contaminado (SP); suelo plantado con *M. sativa* (SM); suelo contaminado sembrado con *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, 30, 60, 120, 240 días

Días	0	7	14	30	60	120	240
S	12.15	12.15	15	15	33.75	21.6	15
SP	12.15	33.75	18.15	29.4	29.4	25.35	25.35
SM		18.15	21.6	25.35	29.4	18.15	25.35
SPM		15	25.35	33.75	29.4	33.75	33.75

El análisis de ventana corrediza (MWA) se realizó para observar los cambios de la comunidad de bacterias y de ciliados a los largo de tiempo en todos los microcosmos de los diferentes tratamientos, este análisis mostró que en la comunidad de bacterias en promedio los microcosmos SM fluctuaron más, por lo tanto tuvieron mayor tasa de cambio 87.15 ± 14.75 y los microcosmos control fueron los que cambiaron menos $\Delta t \ 62.39 \pm 9.36$, en estos últimos se mantuvo en promedio el 50% de la comunidad a lo largo del tiempo, en tanto que en los microcosmos SP, SPM y SM la permanencia de la comunidad fue más baja (Figura 18).

El análisis de ventana corrediza (MWA) de la comunidad de ciliados mostró que los microcosmos SP tuvieron la mayor tasa de cambio $\Delta t \ 75.86 \pm 15.96$, mientras que en los microcosmos control tuvieron la menor tasa de cambio 66.01 ± 19.23 , en estos se observó que la comunidad de ciliados se mantuvo en promedio el 60%, en los microcosmos SM, SPM y SP la permanencia de la comunidad de ciliados fue mucho más baja (Figura 19).

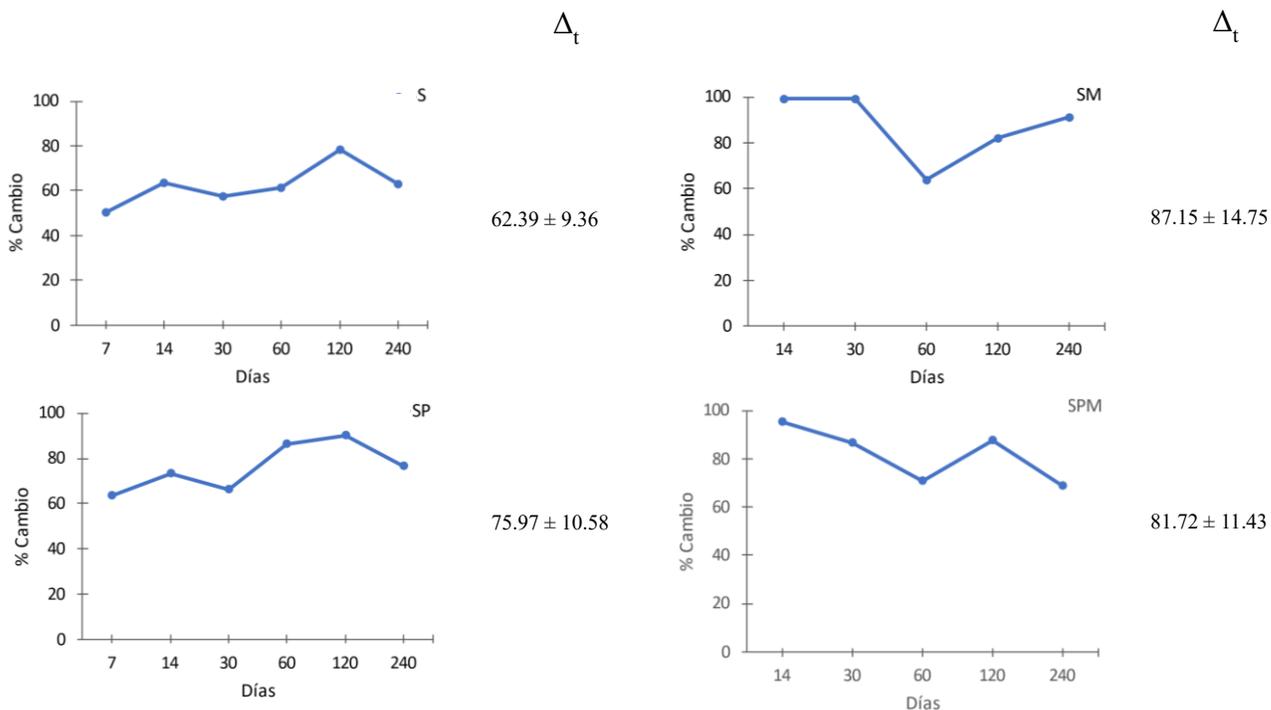


Figura 18. Análisis ventana corrediza (MWA- Moving Windows Analysis) y tasa de cambio (Δ_t) de la comunidad de bacterias

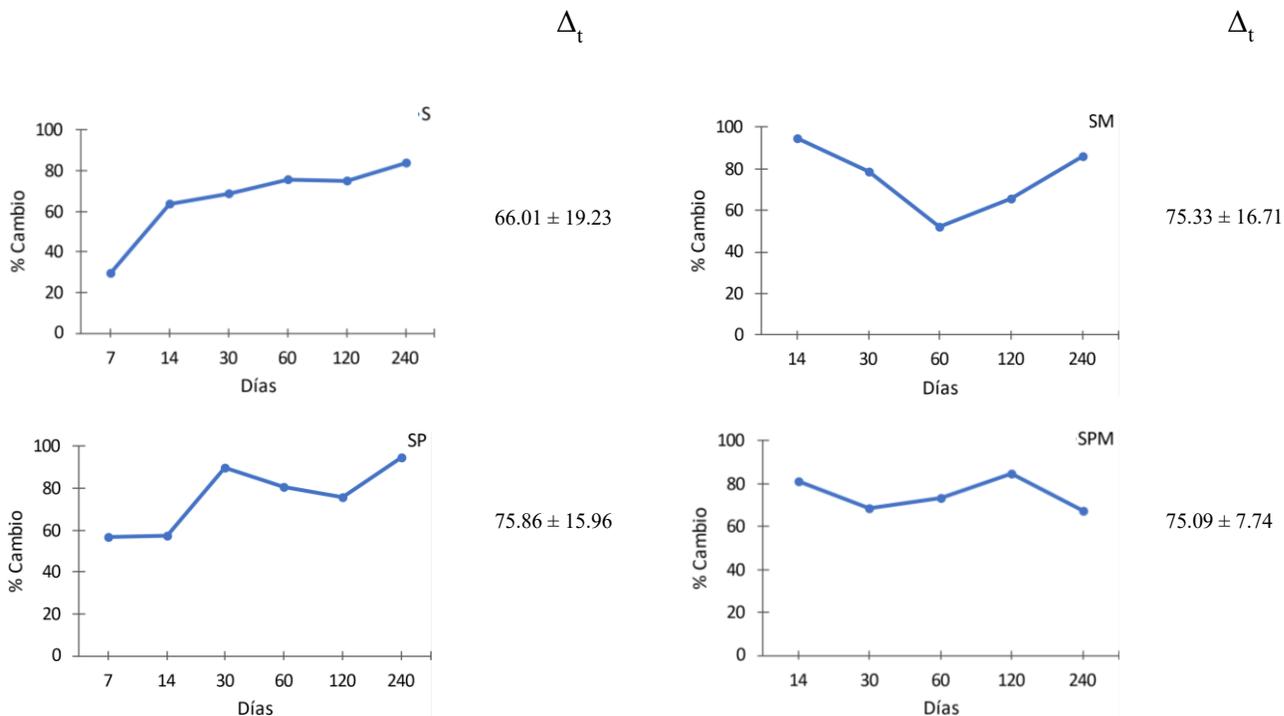


Figura 19. Análisis ventana corrediza (MWA- Moving Windows Analysis) y tasa de cambio (Δ_t) de la comunidad de ciliados

Secuencias

Se cortaron 132 bandas de los geles de DGGE de bacterias, de las cuales solo 52 se pudieron amplificar y secuenciar, de éstas solo 30 tuvieron algún grado de similitud con el dominio bacteria en la base de datos del GenBank. Las secuencias tuvieron un tamaño de 450 a 650 pb, estas secuencias pertenecieron a 5 Phyla: Acidobacteria (20%), Actinobacteria (17%), Bacteroidetes (27%), Firmicutes (3%) y Proteobacteria (33%) (Figura 20). Algunos de los géneros que representaron a estos Phyla fueron *Burkholderia*, *Chryseolinea*, *Luteitalea*, *Steroidobacter*, *Streptomyces* y *Vicinamibacter* (Tabla 6).

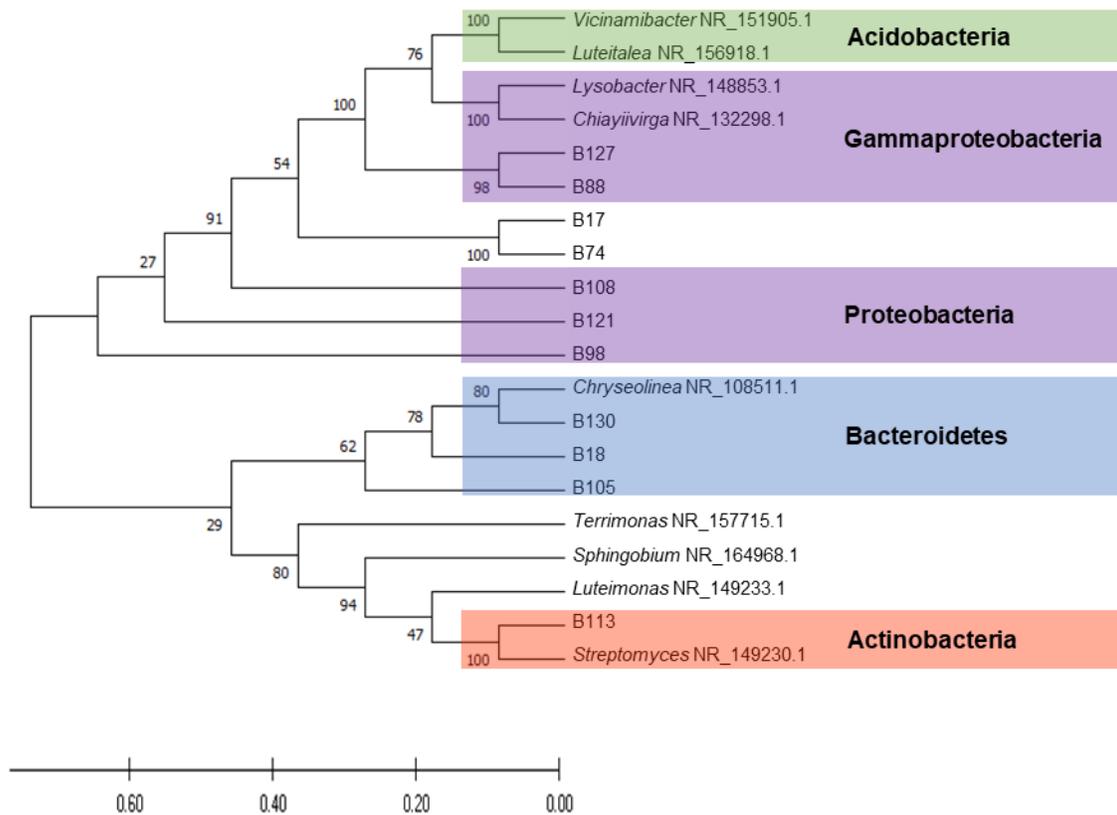


Figura 20. Árbol filogenético construido con las secuencias de bacterias del gen 16S rRNA y secuencias del GENBANK construidas mediante el método Neighbor-joining

Tabla 6. Identities of bacteria detected through the sequencing of the bands of the profiles of DGGE					
Secuencia	Afiliación taxonómica (Filo, clase)	grupo	% Cobertura	% Identidad	Coincidencia a grupo más cercano y No. De acceso
4b	Acidobacteria; Vicinamibacteria		62 68	84.64 82.04	<i>Luteitalea pratensis</i> NR_156918 <i>Vicinamibacter silvestris</i> NR_151905
8b	Proteobacteria; Betaproteobacteria		28 28	74.03 74.03	<i>Acidovorax monticola</i> NR_164911 <i>Mitsuaria noduli</i> NR_159302
17b	Actinobacteria; Micrococcales		81	76.05	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> NR_074770

		81	76.05	<i>Arthrobacter humicola</i> NR_041546
18b	Bacteroidetes; Cytophagia	77 70	75.2 73.14	<i>Chryseolinea serpens</i> NR_108511 <i>Cesiribacter andamanensis</i> NR_116974
64b	Actinobacteria; Micrococcales	14	72.84	<i>Phycococcus cremeus</i> NR_116717
65b	Proteobacteria; Betaproteobacteria	89 89	83.06 81.79	<i>Burkholderia catarinensis</i> NR_153664 <i>Paraburkholderia sacchari</i> NR_025097
74b	Acidobacteria; Vicinamibacteria	84 84	77.68 77.13	<i>Vicinamibacter silvestris</i> NR_151905 <i>Luteitalea pratensis</i> NR_156918
81b	Proteobacteria; Gammaproteobacteria	99 98	71.76 71.13	<i>Steroidobacter agariperforans</i> NR_134189 <i>Povalibacter uvarum</i> NR_126172
88b	Proteobacteria; Gammaproteobacteria	73 73	80.88 80.62	<i>Luteimonas terrae</i> NR_149233 <i>Lysobacter tolerans</i> NR_148853
93b	Proteobacteria; Betaproteobacteria	68 68	75 75	<i>Burkholderia catarinensis</i> NR_153664 <i>Caballeronia telluris</i> NR_125559
94b	Acidobacteria; Vicinamibacteria	60 64	85.98 84.24	<i>Luteitalea pratensis</i> NR_156918 <i>Vicinamibacter silvestris</i> NR_151905
98b	Proteobacteria; Alphaproteobacteria	94 94	72.76 72.76	<i>Sphingobium chungangianum</i> NR_164968 <i>Sphingobium mellinum</i> NR_133859
99b	Acidobacteria; Vicinamibacteria	68 68	80.95 80.28	<i>Vicinamibacter silvestris</i> NR_151905 <i>Luteitalea pratensis</i> NR_156918
100b	Bacteroidetes; Chitinophagia	26 26	74.83 74.15	<i>Filimonas aquilariae</i> NR_157994 <i>Deminuibacter soli</i> NR_173512
101b	Acidobacteria; Vicinamibacteria	65 65	87.64 87.36	<i>Luteitalea pratensis</i> NR_156918 <i>Vicinamibacter silvestris</i> NR_151905
105b	Bacteroidetes; Chitinophagia	86 86	77.74 77.36	<i>Flavitalea flava</i> NR_164923 <i>Terrimonas terrae</i> NR_157715
107b	Acidobacteria; Vicinamibacteria	60 60	83.43 82.53	<i>Luteitalea pratensis</i> NR_156918 <i>Vicinamibacter silvestris</i> NR_151905
108b	Proteobacteria; Betaproteobacteria	86 86	78.45 78.09	<i>Ramlibacter monticola</i> NR_159166 <i>Aquabacterium olei</i> NR_137381
111b	Proteobacteria; Betaproteobacteria	28 23	74.75 74.75	<i>Cupriavidus plantarum</i> NR_109160 <i>Cupriavidus oxalaticus</i> NR_117018
113b	Actinobacteria; Streptomycetales	98 98	96.02 95.69	<i>Streptomyces andamanensis</i> NR_149230 <i>Streptomyces monticola</i> NR_164930
117b	Firmicutes; Clostridia	43 43	70.25 70.12	<i>Novibacillus thermophilus</i> NR_136797 <i>Desulfofundulus kuznetsovii</i> NR_075068
119b	Actinobacteria; Streptomycetales	12 17	83.87 76.92	<i>Streptomyces erringtonii</i> NR_108855 <i>Streptomyces cerasinus</i> NR_158072

120b	Bacteroidetes; Cytophagia	44	70.32	<i>Hymenobacter persicinus</i> NR_164953
		44	68.35	<i>Hymenobacter crusticola</i> NR_171441
121b	Proteobacteria; Gammaproteobacteria	95	70.14	<i>Steroidobacter agariperforans</i> NR_134189
		78	71.37	<i>Steroidobacter sp</i> NR_170506
124b	Bacteroidetes; Cytophagia	28	73.47	<i>Pontibacter ruber</i> NR_133823
		22	75.63	<i>Dyadobacter psychrotolerans</i> NR_170487
127b	Proteobacteria; Gammaproteobacteria	74	78.54	<i>Lysobacter tolerans</i> NR_148853
		74	78.28	<i>Luteimonas terrae</i> NR_149233
128b	Actinobacteria; Micromonosporales	32	76	<i>Dactylosporangium sucinum</i> NR_145935
		32	76	<i>Dactylosporangium tropicum</i> NR_112813
129b	Bacteroidetes; Chitinophagia	25	77.78	<i>Edaphocola flava</i> NR_165730
			77.78	<i>Edaphocola aurantiacus</i> NR_173598
130b	Bacteroidetes; Cytophagia	82	75.08	<i>Chryseolinea soli</i> NR_165708
		82	75.08	<i>Chryseolinea serpens</i> NR_108511
132b	Bacteroidetes; Cytophagia	70	74.61	<i>Chryseolinea serpens</i> NR_108511
		70	74.61	<i>Chryseolinea soli</i> NR_165708

Se cortaron 93 bandas de los geles de DGGE de ciliados, de las cuales solo 34 se pudieron amplificar y secuenciar, de estas solo 12 tuvieron algún grado de similitud con ciliados en la base de datos del GenBank. Las secuencias tuvieron un tamaño de 400 a 650 pb, estas secuencias correspondieron a las familias Amphiseliidae (25%), Colpodidae (8%), Gonostomatidae (18%) y Oxytrichidae (50%) (Figura 21). Algunos de los géneros que representaron estas familias fueron *Colpoda*, *Gonostomum*, *Lamtostyla*, *Oxytricha*, *Uroleptoides*, *Urosoma* (Tabla 7).

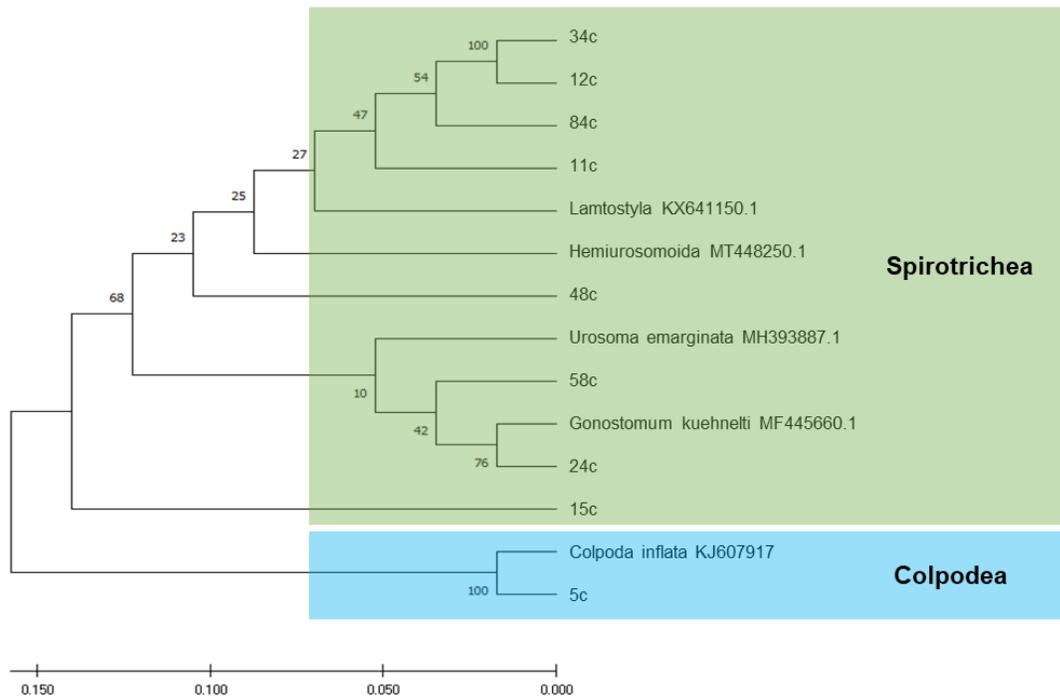


Figura 21. Árbol filogenético construido con las secuencias de ciliados del gen 18S rRNA y secuencias del GENBANK construidas mediante el método Neighbor-joining

Tabla 7. Identidades de ciliados detectados mediante la secuenciación de las bandas de los perfiles de DGGE

Secuencia	Afiliación grupo taxonómico (Orden, Familia)	% Cobertura	% Identidad	Coincidencia a grupo más cercano y No. De acceso
5c	Colpodida; Colpodidae	97	98.73	<i>Colpoda</i> sp. MK801290
		97	98.73	<i>Colpoda inflata</i> KJ607917
11c	Sporadotrichida; Oxytrichidae	97	96.99	<i>Hemiurosomoida warreni</i> MT448250
		97	96.99	<i>Rigidohymena inquieta</i> KY968739
12c	Stichotrichida; Amphiellidae	95	93.31	<i>Lamtostyla salina</i> KX641150
		95	93.31	<i>Uroleptoides salina</i> MW035913
15c	Stichotrichida; Amphiellidae	60	98.23	<i>Lamtostyla ovalis</i> KP266625
		60	98.23	<i>Stichotrichida</i> sp. MN472864
24c	Sporadotrichida; Gonostomatidae	94	98.54	<i>Metagonostomum gonostomoida</i> MT247895
		94	98.54	<i>Gonostomum kuehnelti</i> MF445660
32c	Sporadotrichida; Oxytrichidae	97	79.41	<i>Urosoma emarginata</i> MH393887
		97	79.41	<i>Oxytricha</i> sp. MK039735
34c	Sporadotrichida; Gonostomatidae	96	88.64	<i>Gonostomum kuehnelti</i> MF445660
		96	88.64	<i>Metagonostomum gonostomoida</i> MT247895
36c	Sporadotrichida; Oxytrichidae	92	83.16	<i>Urosoma salmastra</i> MH393884
		92	83.16	<i>Uroleptoides longiseries</i> MH143251
48c	Sporadotrichida; Oxytrichidae	98	98.54	<i>Urosoma emarginata</i> MH393887
		98	98.54	<i>Parabistichella dieckmanni</i> MN994505
58c	Stichotrichida; Amphiellidae	90	93.82	<i>Uroleptoides longiseries</i> MH143251
		90	93.82	<i>Lamtostyla ovalis</i> KP266625
60c	Sporadotrichida; Oxytrichidae	96	97.58	<i>Hemiurosomoida warreni</i> MT448250
		96	97.58	<i>Oxytricha lithofer</i> MT364897
84c	Sporadotrichida; Oxytrichidae	96	88.50	<i>Pseudogastrostyla</i> sp. MH051840
		96	88.50	<i>Heterogastrostyla salina</i> MT739409

DISCUSIÓN

Parámetros del suelo

Uno de los efectos del petróleo en el suelo fue el aumento significativo de MO en los microcosmos contaminados, además de otros cambios en sus características físicas y químicas (Alrumman et al. 2015). El incremento de MO cambió la relación C/N debido al exceso de carbono del petróleo; con este tipo de cambios en los nutrimentos del suelo, los microorganismos tienden a inmovilizar el N por más tiempo (Deni y Penninckx 1999; Xu y Johnson 1997).

En suelos contaminados con petróleo también se ha observado una disminución en las bacterias nitrificantes (Deni y Penninckx 1999; Urakawa et al. 2019), esto también podría explicar las oscilaciones en la cantidad de nitrato que se observan en los microcosmos durante los 240 días, es decir, el incremento en la concentración durante los primeros 30 días y la posterior disminución, podría estar correlacionada con los cambios en las bacterias de este grupo en los diferentes microcosmos. El desequilibrio de nutrientes causado por el exceso de C también provoca la baja disponibilidad de nutrientes en los suelos con petróleo (Jajoo et al. 2014), esto explica la reducción significativa del fósforo disponible durante los 240 días en los microcosmos con petróleo. Sin embargo, las oscilaciones del fósforo disponible fueron más pequeñas que las observadas en el nitrógeno. Lo anterior puede deberse a que todos los organismos contienen fósforo, pero solo algunos grupos pueden fijar nitrógeno, de ahí la mayor oscilación en el contenido de este nutrimento en el suelo. Todas estas limitaciones de nutrientes provocan tensión en las comunidades microbianas del suelo, lo que lleva a cambios en la composición de las especies (Zhang et al. 2018).

Degradación de hidrocarburos

La concentración de hidrocarburos totales disminuyó después de 7 días, esto puede deberse a varios fenómenos como la fotodegradación, la evaporación y la biodegradación; los dos primeros operan inmediatamente después de la contaminación del suelo (Maliszewska-Kordybach 2005).

La participación de las plantas en la eliminación de contaminantes del suelo ha sido reportada ampliamente en estudios de fitorremediación. *Medicago sativa* participa en la reducción de los hidrocarburos entre el 80 y 95% (Muratova et al. 2010; Peng et al. 2009; Phillips et al. 2012; Rezek et al. 2008; Wei et al. 2017). En este trabajo después de 240 días los tratamientos con *M. sativa* el petróleo disminuyó 95%. El efecto positivo de *M. sativa* en la degradación de hidrocarburos se atribuye principalmente al incremento de la actividad bacteriana alrededor de las raíces, lo que lleva a una mayor transformación y mineralización de los hidrocarburos (Muratova et al. 2003b; Muratova et al. 2010; Wei et al. 2017). Además de la actividad bacteriana alrededor de las raíces, las peroxidasas secretadas por *M. sativa* también ayudan a la degradación de hidrocarburos (Muratova et al. 2015; Dubrovskaya et al. 2017). Hubo un incremento de la concentración de hidrocarburos de 13 a 26 carbonos (C13 a C26) después de 30 días en ambos tratamientos (SP y SPM). Resultados similares mostraron Lee et al. (2021) en un suelo contaminado con diésel, la concentración de hidrocarburos de 16 a 20 carbonos incremento a los 22 y 37 días. También, Galitskaya et al. (2021) encontraron que los hidrocarburos de cadena larga (C24 a C40) incrementaron su concentración después de 120 días en 3 tipos de suelo diferentes contaminado con petróleo. Se ha descrito que bacterias, cianobacterias, hongos y microalgas sintetizan hidrocarburos de 10 a 30 carbonos (Gennadiev et al. 2015; Ladygina et al. 2006) (Gennadiev et al. 2015; Ladygina et al. 2006).

Después de 30 días también hubo un incremento de ciliados y flagelados que se alimentan de bacterias, hongos y algas. Este incremento de la concentración de los hidrocarburos de 13 a 26 carbonos podría ser resultado de los hidrocarburos del petróleo más los hidrocarburos que los microorganismos sintetizan y los que son parte de los propios microorganismos. Como consecuencia, hay un incremento de la biomasa microbiana después del periodo de aclimatación, este aumento de la comunidad microbiana puede explicar parte del aumento de la cantidad de hidrocarburos totales, ya que la biomasa de bacterias, hongos y microalgas puede ser una fuente importante de hidrocarburos C10 a C30.

Biomasa de *Medicago sativa*

Los resultados muestran que las plantas de *M. sativa* plantadas en el petróleo tuvieron menor crecimiento y por lo tanto menor biomasa. Los hidrocarburos pueden tener efectos negativos en las plantas que van desde la reducción en la germinación, la inhibición de la fotosíntesis y de la asimilación de nutrientes, lo que trae por consecuencia una reducción significativa en el crecimiento vegetal (Jajoo et al. 2014; Peng et al. 2009; Shirdam et al. 2008; Tang et al. 2010). Los cambios físicos y químicos producidos por los hidrocarburos están involucrados en el poco crecimiento de las plantas. Por ejemplo, los cambios físicos como el menor potencial hídrico y la menor disponibilidad de oxígeno limitan seriamente el desarrollo vegetal (Jajoo et al. 2014). Cuando los hidrocarburos recubren las raíces, influyen negativamente en la absorción de nutrientes y de agua (Xu and Johnson 1997), además del desequilibrio de nutrientes por el aumento del carbono y la toxicidad de los hidrocarburos a las plantas (Hussain et al. 2019). Todos estos cambios generan una reducción en la biomasa de las plantas y también está relacionada con la disminución de su fotosíntesis, pues a mayor

concentración de hidrocarburos en el suelo menor tasa fotosintética (Cartmill et al. 2014; Han et al. 2016).

El poco crecimiento de *M. sativa* en suelos contaminados con petróleo ya ha sido descrito. La concentración de hidrocarburos está relacionada con el crecimiento de las plantas, se ha detectado que entre mayor concentración de hidrocarburos menor cantidad de biomasa vegetal (Cartmill et al. 2014; Fan et al. 2008; Minoui et al. 2015; Panchenko et al. 2017). Por otro lado, se ha observado que *M. sativa* puede translocar hidrocarburos a diferentes órganos como tallos, hojas y tricomas (Alves et al. 2017; Zuzolo et al. 2021). Además del incremento de bacterias en la zona de raíces de las de *M. sativa*, se ha observado que los tricomas pueden ayudar a la metabolización de los hidrocarburos (Alves et al. 2017). Otro de los efectos negativos que presentan las plantas crecidas en suelos con petróleo es la disminución en la nodulación, a mayor concentración de hidrocarburos hay menos nódulos en las raíces de *Medicago sativa* (Pourbabae et al. 2021). Esto es causado por varios factores como la baja disponibilidad de nutrientes como el fósforo (Míguez-Montero et al. 2020), además los hidrocarburos inhiben las señales bioquímicas entre bacterias fijadoras de nitrógeno y sus hospedantes. También, se ha reportado la disminución en la capacidad de división celular de la raíz de la planta para formar nódulos, lo que también reduce la fijación de nitrógeno (Anderson et al. 2004).

Efecto del petróleo sobre la comunidad de ciliados y flagelados

El petróleo tuvo varios efectos en la comunidad de ciliados y flagelados: primero, hubo una simplificación extrema de esta comunidad inmediatamente después de la adición de petróleo, esto causó que se encontraran pocas especies y pocos individuos. Los efectos negativos del

petróleo que se han reportado sobre la comunidad de bacterias (Alrumman et al. 2015; Girvan et al. 2005) también aplican para la comunidad de ciliados y flagelados. La disminución de la riqueza de especies y abundancia podría deberse a una combinación de dos fenómenos: 1) la muerte de individuos sensibles, y 2) la reducción de la variedad de fuentes de alimento debido a la perturbación (Rykiel 1985; Stoeck y Edgcomb 2010), lo que resultó en la simplificación de la comunidad de ciliados y flagelados.

El proceso de recuperación de los protozoos inició 7 días después del pulso de contaminación, con un aumento de la riqueza de especies y el número de individuos por especie. El aumento de individuos se debe a que las bacterias capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono, tienden a adaptarse y multiplicarse rápidamente (Bell et al. 2013; Johnsen et al. 2006), por lo que pueden volverse muy abundantes (Hamamura et al. 2006; Margesin et al. 2003) y atraer o activar protozoos bacterívoros que sobrevivieron a la contaminación y comenzar a reestablecer el ciclo de nutrientes.

Se inició un cambio sucesional en todos los microcosmos, luego de que la disponibilidad de agua inició la activación de la comunidad de protozoos. Se encontraron unas pocas especies muy abundantes de ciliados y flagelados durante los primeros días después de la contaminación por petróleo y gradualmente otras especies se fueron integrando a la comunidad de los microcosmos. Varios estudios han reportado este tipo de sucesión de protozoos después de un evento de perturbación, en donde después de la disminución en la diversidad de especies esta se recupera gradualmente (Ekelund et al. 2003; Holtze et al. 2003; Lara et al. 2007b). Los cambios en la comunidad de protozoos fueron más lentos en los microcosmos control (S) en comparación con el microcosmos SP. Respecto a los microcosmos con planta, la influencia de *M. sativa* provocó que la sucesión de especies ocurriera más rápidamente.

La presencia de *M. sativa* tuvo un efecto positivo en la comunidad, ya que mostró la mayor riqueza de especies en los microcosmos con petróleo plantado con esta leguminosa. Este efecto se debe al aumento de la actividad microbiana en la zona de la raíz. Por tanto, el aumento de la diversidad de protozoos es una consecuencia indirecta del efecto de la zona de raíces de *M. sativa* (Bouwman y Zwart 1994; Cortés-Pérez et al. 2014; Griffiths 1990), ya que esta planta estimula bacterias heterótrofas y bacterias que degradan hidrocarburos, incluidas especies capaces de metabolizar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Kirk et al. 2005b; Muratova et al. 2003b).

La simplificación de la comunidad de ciliados y flagelados debido a la adición de petróleo permitió que las especies de los géneros *Colpoda*, *Spumella*-like, *Bodo*, *Neobodo* y *Cercomonas* aumentaran su abundancia. Estos protozoos son los depredadores microbianos más comunes y abundantes en los suelos (Domonell et al. 2013; Ekelund y Rønn 1994; Foissner 1991b) y los que toleraron un pulso de contaminación de 50g/kg de petróleo. En consecuencia, estas especies dominaron la comunidad en los microcosmos con petróleo en los primeros 14 días. Estos géneros de protozoos se han vuelto característicos de los suelos perturbados, incluidos los contaminados por hidrocarburos y metales pesados (Brinch et al. 2002; Ekelund et al. 2003; Holtze et al. 2003). Probablemente estos géneros estén agrupando especies generalistas con estrategias de supervivencia muy efectivas. Por ejemplo, el ciliado *Colpoda* tiene una estrategia que puede generar quistes reproductivos, de los cuales pueden emerger de 4 a 8 individuos, dependiendo de la especie (Lüftenegger et al. 1985). Por otro lado, la reducción de la población de especialistas puede permitir que los generalistas se desarrollen debido a la disminución de la competencia por los recursos.

Después de 60 días, los microcosmos control (S) también presentaron una reducción de especies y un incremento en la dominancia de *Colpoda*, *Spumella-like*, *Bodo*, *Neobodo* y *Cercomonas*, esto debido a que no hubo aporte de nutrientes en estos microcosmos y probablemente la limitación y la poca variedad de recursos provocó la reducción de especies y la dominancia de estos protozoos característicos de suelos perturbados.

Similitud

Las comunidades de ciliados y flagelados fueron más similares entre los tratamientos con petróleo sin importar el tiempo, sugiriendo que el petróleo es un factor importante en la selección de especies. Resultados similares reportó Cortes-Pérez et al. (2014), en donde las comunidades de amebas son más parecidas entre los tratamientos con hidrocarburos. También, Ding et al. (2012) encontró que las comunidades de bacterias en suelos con hidrocarburos fueron más similares entre ellas. Entre los microcosmos contaminados y no contaminados solo fueron similares los microcosmos SPM30 con SM7 compartiendo poco más del 55% de información, probablemente este parecido se deba al efecto de la *M. sativa*. Estos resultados pueden interpretarse como una muestra del tiempo que le toma a la leguminosa y los microorganismos para sobreponerse a las adversidades ocasionadas por el petróleo en el suelo. Al grado que la comunidad de protozoos estaba apenas dando muestras de recuperación 30 días después del pulso de contaminación, probablemente la situación de estrés en la planta con petróleo retrasó el efecto benéfico de las raíces hasta los 30 días.

Índices de diversidad

La comunidad de ciliados y flagelados se estabilizó debido a la recuperación de especies raras, como lo revela el índice de Shannon (H'), y el aumento de la biomasa de las especies dominantes a lo largo de la construcción de la estructura de la comunidad tuvo lugar en 30 días, según lo revelado por el índice de Simpson ($1/D$). Este lapso permitió observar el desarrollo de una estructura comunitaria con especies comunes y raras, y una notoria disminución de las especies que dominaron durante los primeros días posteriores a la contaminación. Por el contrario, la diversidad se mantuvo alta en los microcosmos sin petróleo a lo largo de los primeros 30 días del experimento, mostrando solo pocas especies con alta abundancia de individuos. Sin embargo, después de 60 días la diversidad disminuyó en los microcosmos control, teniendo menos número de especies con mayor dominancia, lo que ocurrió por el nulo aporte de nutrientes del exterior, al haber menor cantidad de nutrientes el suelo solo puede mantener pocas especies, a diferencia de los microcosmos SM en donde gracias a los aportes de la planta permitió mantener mayor cantidad de especies. En los microcosmos SP la diversidad disminuyó hasta los 120 días y en los microcosmos SPM hasta los 240. También en la comunidad de bacterias se ha reportado la simplificación de la comunidad y la disminución de la uniformidad como consecuencia de la contaminación por hidrocarburos (Ding et al. 2012; Gan et al. 2018). Además de la disminución de la abundancia de bacterias, como la que también se presenta en este trabajo.

Efecto del petróleo sobre los grupos tróficos de ciliados y flagelados

La contaminación por petróleo redujo inmediatamente, el número de especies por grupo trófico, así como la variedad de grupos. Sin embargo, el efecto raíz de *M. sativa* ayudó a la

recuperación de todos los grupos tróficos en el suelo después de 30 días del experimento. El tiempo de recuperación de los grupos tróficos de protozoos en el presente estudio es muy similar al que presentan las amebas de vida libre en un suelo contaminado con hexano y sembrado con *M. sativa*, que también tardó 30 días en completar la recuperación (Cortés-Pérez et al. 2018).

Los protozoos bacterívoros suelen ser los más abundantes en todos los suelos (Trap et al. 2016), pero en suelos contaminados con petróleo, incluso representan más del 90% de la comunidad de protozoos (Cortés-Pérez et al. 2014; Lara et al. 2007b). En este trabajo, los ciliados y flagelados bacterívoros dominaron los tratamientos con petróleo durante los primeros 14 días, lo que sugiere que el recambio de la materia orgánica se está llevando a cabo a través de la vía bacteriana.

El aumento de la diversidad de bacterívoros después de 14 días puede estar relacionado con una creciente diversidad bacteriana en los microcosmos con petróleo durante ese tiempo (Batani et al. 2016; Saleem et al. 2013; Trap et al. 2016), permitiendo el desarrollo de especies de ciliados y flagelados bacterívoros previamente inhibidos por el pulso de contaminación. Se ha observado que cuando hay más variedad de presas los depredadores pueden beneficiarse de una dieta más equilibrada (Gamfeldt et al. 2005), probablemente la mezcla de presas satisface mejor sus necesidades nutricionales. Esto también puede favorecer la diversidad de depredadores, Saleem et al. (2012) encontró que la riqueza de depredadores tuvo un efecto positivo en la producción de más depredadores, mientras que la abundancia de bacterias se redujo significativamente en presencia de múltiples depredadores, lo que indica una explotación más fuerte de las presas. Esto potencia una mayor diversidad en el grupo trófico bacterívoro que, a su vez, se asocia con un uso más eficiente de los recursos (Cardinale et al. 2006).

Los bacterívoros más abundantes en los tratamientos del petróleo fueron las especies de *Colpoda*, *Spumella*-like, *Bodo*, *Neobodo* y *Cercomonas*, que son cruciales para la transformación de nutrientes de la biomasa bacteriana a otros niveles de la red trófica del suelo (Ekelund y Rønn 1994). Estos protozoos fueron probablemente los que facilitaron la presencia de otras especies de bacterias, al liberar importantes nutrientes ya fijados en las bacterias resistentes al petróleo.

Algunos grupos tróficos de ciliados y flagelados tardaron más en recuperarse, ya que existe un umbral de abundancia de presas para alimentarlos. La baja densidad de presas o la ausencia de sus presas favoritas pueden limitar la capacidad de estas poblaciones de protozoos para prosperar en un ambiente contaminado (Gast et al. 2009). En consecuencia, su activación fisiológica requiere la mejora de las condiciones del suelo lo suficiente como para que la población de sus presas sea numerosa.

La eliminación de los grupos tróficos por el petróleo permitió rastrear los tiempos en que estos grupos comenzaron a reorganizarse. Los osmótrofos (*Polytoma*) se recuperaron una semana después de la adición de petróleo; estos flagelados se alimentan de compuestos orgánicos disueltos. También el género *Astasia* (osmotrófos) posiblemente estos flagelados se alimentan de compuestos de bajo peso molecular fácilmente degradables presentes en la mezcla de hidrocarburos o de compuestos que son producto de la degradación de hidrocarburos, razón por la cual proliferaron después de 7 días en los tratamientos con petróleo y en los tratamientos sin petróleo fueron raros.

El grupo fungívoro-bacterívoro (*Platyoprya*) logró recuperarse en los microcosmos con petróleo en los primeros 14 días. Se ha observado que el petróleo genera una reducción en la diversidad de especies de hongos y favorece el desarrollo de hongos resistentes (Obire y

Anyanwu 2009). Probablemente, no hubo suficiente biomasa fúngica y/o especies de hongos para sustentar a los fungívoros inmediatamente después de la contaminación por petróleo, lo que explicaría la ausencia de este grupo antes de los 14 días.

Las redes tróficas se simplificaron después del impacto del petróleo hasta tal punto que solo permanecieron activos los bacterívoros. Es posible proponer que los omnívoros estarían sustituyendo especies bacterívoras sensibles debido a la falta de competencia, ayudando a la reorganización de la red trófica del suelo dentro de los primeros 14 días y funcionando como estabilizadores de la red trófica (Holyoak y Sachdev 1998; Kratina et al. 2012).

Los autótrofos aparecieron en los microcosmos contaminados con petróleo plantados con *M. sativa* a los 30 días, lo que permitió la presencia de ciliados que se alimentan de autótrofos, como *Trithigmotoma* sp. Esto podría deberse a quelantes liberados por las plantas, lo que aumenta la disponibilidad de algunos nutrientes como el hierro (Dotaniya y Meena 2015), que son indispensables para las algas y otros autótrofos para comenzar a prosperar. Los resultados de este trabajo muestran el efecto benéfico generado por el establecimiento de leguminosas. Este efecto benéfico de la planta puede deberse a una mayor disponibilidad y movilidad de nutrientes que alimentan las poblaciones microbianas en la zona radicular. Al haber más recursos disponibles y a su vez favorecen la recuperación de los grupos tróficos de ciliados y flagelados que fueron reducidos a causa de la contaminación por con petróleo. Este proceso de recuperación con *M. sativa* está casi completo en tan solo 30 días después del pulso de contaminación. Mientras que, en los microcosmos con petróleo y sin planta, la recuperación de todos los grupos tróficos tardó el doble de tiempo (60 días).

La recuperación de la comunidad de protozoos realza la importancia del funcionamiento de especies redundantes en el sistema. La pérdida de especies debido a cualquier tipo de perturbación es bastante común, provocando la reducción de la diversidad dentro de los

grupos funcionales. Sin embargo, las especies redundantes evitan una pérdida completa de la funcionalidad del grupo (Naeem 1998). Las especies raras se pueden considerar como un banco de semillas de recursos genéticos, y se supone que incluyen especies ecológicamente redundantes que podrían aumentar en abundancia después de la perturbación ambiental para mantener el funcionamiento continuo del ecosistema (Gözdereliler et al 2013), sin embargo, las especies comunes que son resistentes a diferentes perturbaciones y además que son generalistas también podrían mantener y ayudar a la recuperación de las funciones en ambientes perturbados.

Efecto del petróleo sobre las UFC de bacterias

Los hidrocarburos pueden cambiar la composición de la comunidad microbiana, a corto o largo plazo, dependiendo de la susceptibilidad de las poblaciones a la toxicidad de los hidrocarburos (Robertson et al. 2007). En el tiempo 0, el efecto del petróleo sobre la comunidad de bacterias fue menos drástico que el efecto en la comunidad de protozoos; si bien en el tiempo 0 el número de UFC fue más bajo que en el control, el pulso fuerte de contaminación por petróleo hizo disminuir significativamente las UFC en el tratamiento SP hasta después de 7 días. Estos resultados son similares a los presentados por Li et al. (2007), en donde en concentraciones de 10 a 50g/kg de diésel disminuye significativamente el número total de UFC durante los primeros 5 días, lo que sugiere una toxicidad potencial de las bacterias a altas concentraciones de hidrocarburos. Después de 14 días el número de UFC se recuperó, probablemente de los 7 a los 14 días fue el periodo de aclimatación al petróleo, pues se ha observado que las comunidades bacterianas se adaptan rápidamente a la contaminación por hidrocarburos y los utilizan como fuente de energía (Bell et al. 2013;

Johnsen et al. 2006). La recuperación del número de bacterias coincidió con la reducción significativa de los hidrocarburos de 13 a 22 carbonos. En otros trabajos también se ha reportado el aumento de bacterias y la disminución de los alcanos en estudios de microcosmos, sugiriendo que las bacterias del suelo utilizan activamente alcanos como fuentes de carbono y energía durante las primeras semanas después de la adición de hidrocarburos (Khomarbaghi et al. 2019).

Por otro lado, el tratamiento SPM a los 7 días, presentó valores altos de UFC muy similares a los que registró SM, probablemente la emergencia de las plántulas de *M. sativa* ayudó a que las bacterias se activaran, reduciendo con ello el tiempo de aclimatación en comparación con las UFC registradas en el tratamiento SP. Estos resultados pueden ser consecuencia de que las comunidades microbianas del suelo cambian rápidamente en respuesta al establecimiento de las plantas, además de que la densidad y/o composición de la comunidad del suelo cambia en respuesta a los diferentes tipos de plantas (Bever et al. 2012; Sheridan et al. 2017), así como a la etapa de desarrollo en la que se encuentren las mismas (Sugiyama et al. 2014).

Análisis molecular

Los filos que representaron el mayor porcentaje de la comunidad de bacterias en los microcosmos fueron Proteobacteria y Acidobacteria. Estos filos junto con Actinobacteria son los más abundantes en los suelos, también las Proteobacterias y Actinobacterias son las más abundantes en suelos contaminados por hidrocarburos y las que participan en la degradación

de estos (Janssen 2006; Mukherjee et al. 2014; Storey et al. 2018). Los resultados del presente trabajo no son una descripción exhaustiva de la diversidad bacteriana o la estructura de la comunidad de los diferentes tratamientos, pero muestran la estructura bacteriana de los microcosmos contaminados y no contaminados.

Los géneros de bacterias *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Chryseolinea*, *Luteimonas*, *Luteitalea*, *Lysobacter*, *Pontibacter*, *Steroidobacter*, y *Vicinamibacter* se detectaron en todos los microcosmos, todas estas bacterias son Gram-negativas, se ha reportado que estas bacterias son más tolerantes a los hidrocarburos (Lăzăroaie 2010; Shahi et al. 2016). Las bacterias Gram-negativas tienen una membrana externa que actúa principalmente como una barrera de permeabilidad selectiva, por lo que los hidrocarburos no pueden difundir libremente a través de ella, esto las ayuda a ser más tolerantes a los hidrocarburos (Parales y Ditty 2017), esto las hace más abundantes que las bacterias Gram-positivas en suelos contaminados con hidrocarburos. El género *Streptomyces* también se detectó en todos los tratamientos, estas bacterias son Gram-positivas. Los géneros *Streptomyces* y *Burkholderia* han sido utilizadas ampliamente como parte de consorcios microbianos para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, debido a su capacidad de degradar hidrocarburos (Al-Mailem et al. 2017; Castro-Silva et al. 2013; Morya et al. 2020; Tardif et al. 2016; Zafra et al. 2017).

Todas las secuencias de ciliados estuvieron representadas por 3 familias Amphiselliidae, Colpodidae y Oxytrichidae; dentro de estas familias se encontraron los géneros *Colpoda*, *Gonostomum*, *Oxytricha* y *Urosoma*, estos ciliados son muy comunes en los suelos, estos géneros han sido reportados en suelos contaminados con hidrocarburos y en suelos con algún tipo de contaminación (Abraham et al. 2019; Lara et al. 2007a,b; Li et al. 2010; Shimano et al. 2012). Dos bandas se presentaron en los perfiles de DGGE en todos los tratamientos

durante los 240 días, una de esas bandas fue reconocida como *Colpoda*, estos resultados se complementan con los ya descritos en los datos morfológicos en donde *Colpoda* fue el género más abundante de todos los ciliados durante los 240 días en todos los tratamientos, se ha observado que en suelos contaminados con hidrocarburos son dominados por ciliados pertenecientes a la familia Colpodidae tanto en trabajos morfológicos como moleculares (Jousset et al. 2010; Lara et al. 2007a; Lara et al. 2007b).

Los resultados de diversidad que arrojan la técnica de DGGE deben de interpretarse con cuidado debido a que una banda puede representar múltiples especies y varias bandas pueden pertenecer a una sola especie (Al-Mailem et al. 2017; Neilson et al. 2013; Sekiguchi et al. 2001). Sin embargo, los perfiles de DGGE son una herramienta útil para ofrecer información adicional sobre la estructura de la comunidad y su dinámica de cambio en el tiempo (Gözdereliler et al. 2013; Neilson et al. 2013).

La comunidad de bacterias mostró valores altos en riqueza ponderada ($R_r > 30$) durante los 240 en todos los tratamientos, Marzorati et al (2008) describe que comunidades con valores altos de R_r son típicas de ambientes muy habitables (con amplia capacidad de carga), caracterizados por una alta diversidad microbiana. Sin embargo, en los tratamientos con petróleo la riqueza ponderada fue menor los días 0 y 7, después del día 14 está incrementó. Se ha observado que entre menor contaminación hay mayor riqueza ponderada (Ferrera-Rodríguez et al. 2013). Después de 14 días hubo una disminución en la concentración de hidrocarburos que en su mayoría fueron alcanos de 12 a 26 carbonos, lo que sugiere que una vez que las bacterias se adaptaron y consumieron el petróleo incrementaron su riqueza. En estudios de biorremediación se ha observado que los alcanos del petróleo son los que

consumen primero las bacterias (Afzal et al. 2013; Atlas y Bragg 2009; De Pasquale et al. 2012).

La comunidad de ciliados mostró valores de Rr intermedios (10-30) en los tratamientos S, SP y SM, estos pueden correlacionarse con una riqueza ponderada de rango medio (Marzorati et al. 2008). Mientras que los tratamientos SPM después de 14 días mostraron valores altos de $Rr > 30$. Estos resultados muestran que *M. sativa* favoreció la recuperación de la comunidad más rápido después de una contaminación de alta intensidad, pero de corta duración. En estudios de suelos permanentemente contaminados con hidrocarburos se ha observado que los valores de riqueza de ciliados permanecen bajos (Jousset et al. 2010; Lara et al. 2007a). Es importante resaltar que este tipo de análisis se han realizado solo en comunidades bacterianas, por lo que en un futuro será importante calibrar este análisis en comunidades de protozoos y otras comunidades microbianas.

Los análisis de ventana corrediza (MWA) y tasa de cambio describen la estabilidad y el recambio de especies a lo largo del tiempo (Pereira e Silva et al. 2012). Tanto para la comunidad de bacterias como de ciliados estos análisis indicaron cambios más altos en los microcosmos SP, SPM y SM, mientras que los cambios observados en los microcosmos control fueron más bajos. Este tipo de cambios grandes indican una dinámica de la comunidad microbiana amplia, muchas especies llegan a ser dominantes y abandonan la comunidad en esos periodos (Marzorati et al. 2008). La comunidad de microbiana de los microcosmos SP, SMP y SM cambió la composición del ensamblaje de la comunidad y tuvo mayor tasa de recambio de especies de debido al efecto del petróleo y el efecto de *M. sativa* durante los 240 días. Las comunidades microbianas asociadas a las raíces de las plantas son susceptibles a cambios, estos dependen tanto de la

especie de planta como de la etapa de crecimiento en la que se encuentre la misma. Además, la comunidad microbiana en suelos contaminados con hidrocarburos está sujeta a cambios en la composición de la comunidad durante las diferentes etapas de la degradación de los hidrocarburos (Inceoğlu et al. 2010; Leal et al. 2017; Militon et al. 2010 Yu et al. 2022).

En resumen, los resultados del análisis molecular tanto de bacterias como de ciliados son muy similares a los resultados dependientes de cultivo, en ambos casos se muestra la disminución de la diversidad como efecto de la contaminación por petróleo y el reensamblaje de la comunidad de estos microorganismos a lo largo de los 240 días. Así como también se muestra la recomposición de la comunidad de ciliados y flagelados y la recuperación de las funciones de estos en los suelos con petróleo.

Conclusión

El efecto inmediato de la contaminación por petróleo es la reducción de la diversidad y de las funciones de las especies, esto genera una simplificación en las redes tróficas. El petróleo es el factor más importante que estructura la comunidad, los miembros de la comunidad que pueden tolerar y utilizar el petróleo, aumentan su abundancia e inician la recuperación de la diversidad de la comunidad microbiana y de sus funciones. La utilización de *M. sativa* para la remediación de suelos favorece la disponibilidad y movilidad de nutrientes, estas características tienen efectos importantes en la estructura y diversidad de la comunidad de bacterias, ciliados y flagelados, además de una manera más rápida, y al mismo tiempo la interacción planta-microorganismos mejoran sinérgicamente la degradación de los hidrocarburos del petróleo.

Referencias bibliográficas

- Abraham, J. S., Sripoorna, S., Dagar, J., Jangra, S., Kumar, A., Yadav, K., et al. (2019). Soil ciliates of the Indian Delhi Region: Their community characteristics with emphasis on their ecological implications as sensitive bio-indicators for soil quality. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1305. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2019.04.013>
- Adl, M. S., & Gupta, V. V. S. R. (2006). Protists in soil ecology and forest nutrient cycling. *Canadian Journal of Forest Research*, 36(7), 1805–1817. <https://doi.org/10.1139/X06-056>
- Adl, S. M. (2003). *The ecology of soil decomposition* *The ecology of soil decomposition*. CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851996615.0000>
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., et al. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119. <https://doi.org/10.1111/JEU.12691>
- Adl, S. M., & Coleman, D. C. (2005). Dynamics of soil protozoa using a direct count method. *Biology and Fertility of Soils*, 42(2), 168–171. <https://doi.org/10.1007/S00374-005-0009-X/TABLES/1>
- Aescht, E., Foissner, W., & Mulisch, M. (1991). Ultrastructure of the mycophagous ciliate *Grossglockneria acuta* (Ciliophora, Colpodea) and phylogenetic affinities of colpodid ciliates. *European Journal of Protistology*, 26(3–4), 350–364.
- Afzal, M., Yousaf, S., Reichenauer, T. G., & Sessitsch, A. (2013). Ecology of Alkane-Degrading Bacteria and Their Interaction with the Plant. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 2, 975–989. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.CH92>
- Agnello, A. C., Bagard, M., van Hullebusch, E. D., Esposito, G., & Huguenot, D. (2016). Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of The Total Environment*, 563–564, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>
- Al-Mailem, D. M., Kansour, M. K., & Radwan, S. S. (2017). Capabilities and limitations of DGGE for the analysis of hydrocarbonoclastic prokaryotic communities directly in environmental samples. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00495. <https://doi.org/10.1002/MBO3.495>
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 27, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>
- Alves, W. S., Manoel, E. A., Santos, N. S., Nunes, R. O., Domiciano, G. C., & Soares, M. R. (2017). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Medicago sativa* L. by fluorescence microscopy. *Micron*, 95, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.01.004>
- Anderson, A., Baldock, J. A., Rogers, S. L., Bellotti, W., & Gill, G. (2004). Influence of chlorsulfuron on rhizobial growth, nodule formation, and nitrogen fixation with chickpea. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55(10), 1059–1070. <https://doi.org/10.1071/AR03057>
- Anderson, T. ., Guthrie, E., & Walton, B. . (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science & Technology*, 27(13), 2630–2636.

- <https://doi.org/10.1021/es00049a001>
- Atlas, R., & Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not – the Exxon Valdez experience. *Microbial biotechnology*, 2(2), 213. <https://doi.org/10.1111/J.1751-7915.2008.00079.X>
- Azary, A. M., Mohebbi, F., Eimanifar, A., Javanmard, A., & Aliyev, A. F. Q. (2010). Species Composition, Ecological Parameters and Seasonal Changes of Planktonic Ciliates Population in Bukan Dam Reservoir. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(1), 102–106. <https://thescipub.com/pdf/10.3844/ajabssp.2010.102.106>. Accessed 16 November 2018
- Bamforth, S. S. (1992). Sampling and enumerating soil protozoa. In A. T. Lee, John J. Soldo (Ed.), *Protocols in protozoology* (p. B-5.1). Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Barry S.C.Leadbeater, & and J.C.Green. (2000). *The Flagellates: Unity, diversity and evolution*. (Barry S.C.Leadbeater & and J.C.Green, Eds.) (First.). New York: Taylor & Francis Group. [file:///C:/Users/Salvador/Downloads/\[Barry_S.C._Leadbeater_and_J.C._Green\]_The_flagellates\(BookFi\).pdf](file:///C:/Users/Salvador/Downloads/[Barry_S.C._Leadbeater_and_J.C._Green]_The_flagellates(BookFi).pdf). Accessed 4 October 2017
- Batani, G., Pérez, G., Martínez de la Escalera, G., Piccini, C., & Fazi, S. (2016). Competition and protist predation are important regulators of riverine bacterial community composition and size distribution. *Journal of Freshwater Ecology*, 31(4), 609–623. <https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1209443>
- Bell, T. H., El-Din Hassan, S., Lauron-Moreau, A., Al-Otaibi, F., Hijri, M., Yergeau, E., & St-Arnaud, M. (2013). Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *The ISME Journal*, 8, 331–343. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.149>
- Bever, J. D., Platt, T. G., & Morton, E. R. (2012). Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 265–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150107>
- Boenigk, J., & Arndt, H. (2002). *Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies*. *Antonie van Leeuwenhoek* (Vol. 81).
- Bonkowski, M. (2004). Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist*, 162(3), 617–631. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x>
- Bouwman, L. A., & Zwart, K. B. (1994). The ecology of bacterivorous protozoans and nematodes in arable soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90040-X)
- Brinch, U. C., Ekelund, F., & Jacobsen, C. S. (2002). Method for spiking soil samples with organic compounds. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1808–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1808-1816.2002>
- Busse, I., & Preisfeld, A. (2003). Systematics of primary osmotrophic euglenids: A molecular approach to the phylogeny of Distigma and Astasia (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 617–624. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.02295-0/CITE/REFWORKS>
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443, 989–992. <https://doi.org/10.1038/nature05202>
- Cartmill, A. D., Cartmill, D. L., & Alarcón, A. (2014). Controlled Release Fertilizer Increased Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Sandy Soil. *International*

- Journal of Phytoremediation*, 16(3), 285–301.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2013.773280>
- Castro-Silva, C., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Valenzuela-Encinas, C., Alcántara-Hernández, R. J., Navarro-Noya, Y. E., Vázquez-Núñez, E., et al. (2013). The bacterial community structure in an alkaline saline soil spiked with anthracene. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5), 10–10. <https://doi.org/10.2225/VOL16-ISSUE5-FULLTEXT-14>
- Chen, Xiaoyun, Liu, M., Hu, F., Mao, X., & Li, H. (2007). Contributions of soil microfauna (protozoa and nematodes) to rhizosphere ecological functions. *Acta Ecologica Sinica*, 27(8), 3132–3143. [https://doi.org/10.1016/S1872-2032\(07\)60068-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2032(07)60068-7)
- Chen, Xumiao, Shao, C., Lin, X., Clamp, J. C., & Song, W. (2013). Morphology and molecular phylogeny of two new brackish-water species of *Amphisiella* (Ciliophora, Hypotrichia), with notes on morphogenesis. *European journal of protistology*, 49(3), 453–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2012.11.002>
- Chigbo, C., Batty, L., & Bartlett, R. (2013). Interactions of copper and pyrene on phytoremediation potential of *Brassica juncea* in copper–pyrene co-contaminated soil. *Chemosphere*, 90(10), 2542–2548.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.11.007>
- Clarholm, M. (1981). Protozoan grazing of bacteria in soil—impact and importance. *Microbial Ecology*, 7(4), 343–350. <https://doi.org/10.1007/BF02341429>
- 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 2013 67:2*, 67(2), 430–442. <https://doi.org/10.1007/S00248-013-0305-1>
- Cortés-Pérez, S., Rodríguez Zaragoza, S., Ferrera-Cerrato, R., & Luna-Pabello, V. M. (2018). Recovery of Amoebae Community in the Root Soil of *M. sativa* after a Strong Contamination Pulse with n-Hexane. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(9), 293. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3944-5>
- Coûteaux, M.-M., & Darbyshire, J. (1998). Functional diversity amongst soil protozoa. *Applied Soil Ecology*, 10(3), 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00122-X](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00122-X)
- De Pasquale, C., Palazzolo, E., Piccolo, L. Lo, & Quatrini, P. (2012). Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria. <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2012.645786>, 47(3), 374–381.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2012.645786>
- Deines, P., Matz, C., & Jürgens, K. (2009). Toxicity of violacein-producing bacteria fed to bacterivorous freshwater plankton. *Limnology and Oceanography*, 54(4), 1343–1352. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.4.1343>
- Deni, J., & Penninckx, M. J. (1999). Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon- polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4008–4013. <https://doi.org/10.1128/aem.65.9.4008-4013.1999>
- Ding, G. C., Heuer, H., & Smalla, K. (2012). Dynamics of bacterial communities in two unpolluted soils after spiking with phenanthrene: Soil type specific and common responders. *Frontiers in Microbiology*, 3(AUG).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00290>
- Domonell, A., Brabender, M., Nitsche, F., Bonkowski, M., & Arndt, H. (2013). Community structure of cultivable protists in different grassland and forest soils of Thuringia. *Pedobiologia*, 56(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.PEDOBI.2012.07.001>

- Dotaniya, M. L., & Meena, V. D. (2015). Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants: A Review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1007/s40011-013-0297-0>
- Dubrovskaya, E. V., Pozdnyakova, N. N., Golubev, S. N., Grinev, V. S., & Turkovskaya, O. V. (2017). Peroxidases from Alfalfa Roots: Catalytic Properties and Participation in Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *ISSN Russian Journal of Plant Physiology Original Russian Text* ©, 64(2), 1021–4437.
<https://doi.org/10.1134/S1021443717010058>
- Ekelund, F. (2002). A study of the soil flagellate *Phalansterium solitarium* Sandon 1924 with preliminary data on its ultrastructure. *Protistology*, 2(3), 152–158.
- Ekelund, F., Olsson, S., & Johansen, A. (2003). Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(11), 1507–1516.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00249-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00249-9)
- Ekelund, F., & Rønn, R. (1994). Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(4), 321–353. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)90068-X)
- Fan, S., Li, P., Gong, Z., Ren, W., & He, N. (2008). Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere*, 71(8), 1593–1598.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.068>
- Ferrera-Rodríguez, O., Greer, C. W., Juck, D., Consaul, L. L., Martínez-Romero, E., & Whyte, L. G. (2013). Hydrocarbon-degrading potential of microbial communities from Arctic plants. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 71–83.
<https://doi.org/10.1111/JAM.12020>
- Finlay, B. J., Black, H. I. J., Brown, S., Clarke, K. J., Esteban, G. F., Hindle, R. M., et al. (2000). Estimating the Growth Potential of the Soil Protozoan Community. *Protist*, 151(1), 69–80. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00008>
- Foissner, W. (1997a). Protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 62(2–3), 93–103. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(96\)01142-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(96)01142-5)
- Foissner, W. (1997b). Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. *Biology and Fertility of Soils* 1997 25:4, 25(4), 317–339.
<https://doi.org/10.1007/S003740050322>
- Foissner, W. (1991a). Diversity and ecology of soil flagellates. In J. Patterson, David J, Larsen (Ed.), *The biology of free-living heterotrophic flagellates* (Systematic., p. pp.93-112). Clarendon Press Oxford.
<https://eurekamag.com/research/020/886/020886093.php>. Accessed 14 June 2019
- Foissner, W. (1991b). Diversity and ecology of soil flagellates. In L. Patterson, DJ. J (Ed.), *The biology of free-living heterotrophic flagellates* (pp. 93–112). Clarendon Press, Oxford.
- Foissner, W., y Berger, H. (1996). A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*, 35(2), 375–388.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1996.tb01775.x>
- Foissner, W. (1998). An updated compilation of world soil ciliates (Protozoa, Ciliophora),

- with ecological notes, new records, and descriptions of new species. *European Journal of Protistology*, 34(2), 195–235.
- Foissner, W. (1999a). Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes*, 95–112.
- Foissner, W. (1999b). Description of Two New, Mycophagous Soil Ciliates (Ciliophora, Colpodea): *Fungiphrya strobli* n. g., n. sp. and *Grossglockneria ovata* n. sp. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(1), 34–42.
- Foster J.C. (1995). Soil nitrogen. In Alef Kassem and Nannipieri Paolo (Ed.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (pp. 79–87). Academic Press London.
- Galitskaya, P., Biktasheva, L., Blagodatsky, S., & Selivanovskaya, S. (2021). Response of bacterial and fungal communities to high petroleum pollution in different soils. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80631-4>
- Gamfeldt, L., Hillebrand, H., & Jonsson, P. R. (2005). Species richness changes across two trophic levels simultaneously affect prey and consumer biomass. *Ecology Letters*, 8(7), 696–703. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2005.00765.X>
- Gan, L., Wang, J. P., & Wu, Q. S. (2018). Bacterial diversity change in oil-contaminated soils in Jiangnan oilfield via a high-throughput sequencing technique. *Biotechnology*, 17(3), 128–134. <https://doi.org/10.3923/biotech.2018.128.134>
- Gast, R. J., Sanders, R. W., & Caron, D. A. (2009). Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. *Trends in Microbiology*, 17(12), 563–569. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2009.09.001>
- Geisen, S., & Bonkowski, M. (2017). Methodological advances to study the diversity of soil protists and their functioning in soil food webs. *Applied Soil Ecology*. <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2017.05.021>
- Gennadiev, A. N., Pikovskii, Y. I., Tsibart, A. S., & Smirnova, M. A. (2015). Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). *Eurasian Soil Science*, 48(10), 1076–1089. <https://doi.org/10.1134/S1064229315100026>
- Gibson, W. (2017). Kinetoplastea. In *Handbook of the Protists: Second Edition* (pp. 1089–1138). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_7
- Girvan, M. S., Campbell, C. D., Killham, K., Prosser, J. I., & Glover, L. A. (2005). Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, 7(3), 301–313. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00695.x>
- Gözdereliler, E., Boon, N., Aamand, J., De Roy, K., Granitsiotis, M. S., Albrechtsen, H. J., & Sørensen, S. R. (2013). Comparing Metabolic Functionalities, Community Structures, and Dynamics of Herbicide-Degrading Communities Cultivated with Different Substrate Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 367. <https://doi.org/10.1128/AEM.02536-12>
- Graj, W., Lisiecki, P., Szulc, A., Chrzanowski, Ł., & Wojtera-Kwiczor, J. (2013). Bioaugmentation with Petroleum-Degrading Consortia Has a Selective Growth-Promoting Impact on Crop Plants Germinated in Diesel Oil-Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut*, 224, 1676. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1676-0>
- Griffiths, B. S. (1986). Mineralization of nitrogen and phosphorus by mixed cultures of the ciliate protozoan *Colpoda steinii*, the nematode *Rhabditis* SP. and the bacterium

- Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(6), 637–641.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(86\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90087-8)
- Griffiths, B. S. (1990). A comparison of microbial-feeding nematodes and protozoa in the rhizosphere of different plants. *Biology and Fertility of Soils*, 9(1), 83–88.
<https://doi.org/10.1007/BF00335867>
- Hall, J., Soole, K., & Bentham, R. (2011). Hydrocarbon Phytoremediation in the Family Fabacea—A Review. <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2010.495143>, 13(4), 317–332. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.495143>
- Hamamura, N., Olson, S. H., Ward, D. M., & Inskeep, W. P. (2006). Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6316–6324. <https://doi.org/10.1128/AEM.01015-06>
- Han, G., Cui, B. X., Zhang, X. X., & Li, K. R. (2016). The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of *Amorpha fruticosa* seedlings. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(10), 2383–2392.
<https://doi.org/10.1007/s13762-016-1071-7>
- Heifetz, P. B., Fö, B., Osmond, C. B., Giles, L. J., & Boynton, J. E. (2000). *Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in Chlamydomonas reinhardtii Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses I*. www.plantphysiol.org. Accessed 14 April 2020
- Hodge, A., Stewart, J., Robinson, D., Griffiths, B. S., & Fitter, A. H. (1998). Root proliferation, soil fauna and plant nitrogen capture from nutrient-rich patches in soil. *The New Phytologist*, 139(3), 479–494. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.1998.00216.X>
- Holtze, M. S., Ekelund, F., Rasmussen, L. D., Jacobsen, C. S., & Johnsen, K. (2003). Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa: differential effects of mercury. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(9), 1175–1181.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00178-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00178-0)
- Holyoak, M., & Sachdev, S. (1998). Omnivory and the stability of simple food webs. *Oecologia*, 117(3), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s004420050675>
- Hussain, I., Puschenreiter, M., Gerhard, S., Sani, S. G. A. S., Khan, W. us din, & Reichenauer, T. G. (2019). Differentiation between physical and chemical effects of oil presence in freshly spiked soil during rhizoremediation trial. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(18), 18451–18464.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04819-6>
- Inceoğlu, Ö., Salles, J. F., Van Overbeek, L., y Van Elsas, J. D. (2010). Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3675–3684
- Ishigaki, T., & Sleigh, M. A. (2001). Grazing Characteristics and Growth Efficiencies at Two Different Temperatures for Three Nanoflagellates Fed with *Vibrio* Bacteria at Three Different Concentrations. *Microbial Ecology 2001 41:3*, 41(3), 264–271.
<https://doi.org/10.1007/S002480000060>
- Ishigaki, Tetsuji, & Terazaki, M. (1998). Grazing Behavior of Heterotrophic NanoFlagellates Observed with a High Speed VTR System. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(5), 484–487. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05104.x>
- Jajoo, A., Mekala, N. R., Tomar, R. S., Grieco, M., Tikkanen, M., & Aro, E. M. (2014).

- Inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on photosynthetic performance are not related to their aromaticity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *137*, 151–155.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.03.011>
- Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(3), 1719–1728.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006/ASSET/7E97E049-F8C7-41E8-80EC-9D2E4FC07BDB/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0030665400001.JPEG>
- Jeuck, A., & Arndt, H. (2013). A Short Guide to Common Heterotrophic Flagellates of Freshwater Habitats Based on the Morphology of Living Organisms. *Annals of Anatomy*, *164*, 842–860. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.08.003>
- Jezbera, J., Horák, K., & Imek, K. (2005). Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, *52*(3), 351–363.
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.12.001>
- Johnsen, A. R., de Liphay, J. R., Sorensen, S. J., Ekelund, F., Christensen, P., Andersen, O., et al. (2006). Microbial degradation of street dust polycyclic aromatic hydrocarbons in microcosms simulating diffuse pollution of urban soil. *Environmental Microbiology*, *8*(3), 535–545. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00935.x>
- Jousset, A., Lara, E., Nikolausz, M., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2010). Application of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique as an efficient diagnostic tool for ciliate communities in soil. *The Science of the total environment*, *408*(5), 1221–5. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.056>
- Khomarbaghi, Z., Shavandi, M., Amoozegar, M. A., & Dastgheib, S. M. M. (2019). Bacterial community dynamics during bioremediation of alkane- and PAHs-contaminated soil of Siri island, Persian Gulf: a microcosm study. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *16*(12), 7849–7860.
<https://doi.org/10.1007/s13762-018-02198-y>
- Kirk, J. L., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2005a). The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, *133*(3), 455–465.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.002>
- Kirk, J. L., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2005b). The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, *133*(3), 455–465.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2004.06.002>
- Kratina, P., LeCraw, R. M., Ingram, T., & Anholt, B. R. (2012). Stability and persistence of food webs with omnivory: Is there a general pattern? *Ecosphere*, *3*(6), 1–18.
<https://doi.org/10.1890/ES12-00121.1>
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2004). Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *17*(1), 6–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.6>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Ladygina, N., Dedyukhina, E. G., & Vainshtein, M. B. (2006). A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry*, *41*(5), 1001–1014.

- <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.12.007>
- Lara, E., Berney, C., Ekelund, F., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2007a). Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2006.06.017>
- Lara, E., Berney, C., Ekelund, F., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2007b). Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.06.017>
- Lara, E., Cédric, B., Hauke, H., & Antonis, C. (2007). Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3), 365–373. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2007.00387.X>
- Lăzăroaie, M. M. (2010). Multiple Responses of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria to Mixture of Hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 649. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300016>
- Leal, A. J., Rodrigues, E. M., Leal, P. L., Júlio, A. D. L., Fernandes, R. de C. R., Borges, A. C., y Tótoła, M. R. (2017). Changes in the microbial community during bioremediation of gasoline-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 342–351
- Lee, J. J., Leedale, G. F., & Bradbury, P. C. (Phyllis C. (2000). *An illustrated guide to the protozoa : organisms traditionally referred to as protozoa, or newly discovered groups*. Society of Protozoologists
- Lee, Y. Y., Seo, Y., Ha, M., Lee, J., Yang, H., & Cho, K. S. (2021). Dynamics of bacterial functional genes and community structures during rhizoremediation of diesel-contaminated compost-amended soil. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1965817>, 56(10), 1107–1120. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1965817>
- Lekfeldt, J. D. S., & Rønn, R. (2008). A common soil flagellate (*Cercomonas* sp.) grows slowly when feeding on the bacterium *Rhodococcus fascians* in isolation, but does not discriminate against it in a mixed culture with *Sphingopyxis wittflariensis*. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00486.x>
- LI, H., ZHANG, Y., KRAVCHENKO, I., XU, H., & ZHANG, C. gang. (2007). Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. *Journal of Environmental Sciences*, 19(8), 1003–1013. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60163-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60163-6)
- Li, J., Liao, Q., Li, M., Zhang, J., Tam, N. F., & Xu, R. (2010). Community Structure and Biodiversity of Soil Ciliates at Dongzhaigang Mangrove Forest in Hainan Island, China. *Applied and Environmental Soil Science*, 2010, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2010/103819>
- Lüftenegger, G., Foissner, W., & Adam, H. (1985). r- and K-selection in soil ciliates: a field and experimental approach. *Oecologia*, 66(4), 574–579. <https://doi.org/10.1007/BF00379352>
- Lynn, D. H. (2008). *The ciliated protozoa: Characterization, classification, and guide to the literature: Third edition. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature: Third Edition*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8239-9>

- Maliszewska-Kordybach, B. (2005). Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Freshly Contaminated Soils – The Effect of Soil Physicochemical Properties and Aging. *Water, Air, and Soil Pollution*, 168(1–4), 113–128.
<https://doi.org/10.1007/s11270-005-0940-3>
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3085–92.
<https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3085-3092.2003>
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., & Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1571–1581. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2008.01572.X>
- Mascia, F., Girolomoni, L., Alcocer, M. J. P., Bargigia, I., Perozeni, F., Cazzaniga, S., et al. (2017). Functional analysis of photosynthetic pigment binding complexes in the green alga *Haematococcus pluvialis* reveals distribution of astaxanthin in Photosystems. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16641-6>
- Militon, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., et al. (2010). Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 669–681
- Minoui, S., Minai-Tehrani, D., & Shahriari, M. H. (2015). Phytoremediation of Crude Oil-Contaminated Soil by *Medicago sativa* (Alfalfa) and the Effect of Oil on its Growth. In *Phytoremediation for Green Energy* (pp. 123–129). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-7887-0_8
- Morya, R., Salvachúa, D., & Thakur, I. S. (2020). Burkholderia: An Untapped but Promising Bacterial Genus for the Conversion of Aromatic Compounds. *Trends in Biotechnology*, 38(9), 963–975. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2020.02.008>
- Mukherjee, S., Juottonen, H., Siivonen, P., Lloret Quesada, C., Tuomi, P., Pulkkinen, P., & Yrjälä, K. (2014). Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site. *The ISME Journal 2014 8:10*, 8(10), 2131–2142.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.151>
- Muratova, A., Dubrovskaya, E., Golubev, S., Grinev, V., Chernyshova, M., & Turkovskaya, O. (2015). The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 188, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.014>
- Muratova, A., Hübner, T., Narula, N., Wand, H., Turkovskaya, O., Kuschik, P., et al. (2003a). Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological Research*, 158(2), 151–161.
<https://doi.org/10.1078/0944-5013-00187>
- Muratova, A., Hübner, T., Narula, N., Wand, H., Turkovskaya, O., Kuschik, P., et al. (2003b). Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological Research*, 158(2), 151–161.
<https://doi.org/10.1078/0944-5013-00187>
- Muratova, A. Y., Bondarenkova, A. D., Panchenko, L. V., & Turkovskaya, O. V. (2010). Use of integrated phytoremediation for cleaning-up of oil-sludge-contaminated soil. *Applied Biochemistry and Microbiology 2010 46:8*, 46(8), 789–794.
<https://doi.org/10.1134/S0003683810080090>
- Myl'nikov, A. P., & Karpov, S. A. (2004). *Protistology Protistology Protistology*

Protistology Protistology Review of diversity and taxonomy of cercozoans.
Protistology (Vol. 3).

- Naeem, S. (1998). Species Redundancy and Ecosystem Reliability. *Conservation Biology*, 12(1), 39–45. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1998.96379.x>
- Neilson, J. W., Jordan, F. L., & Maier, R. M. (2013). Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 256–263. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2012.12.021>
- Nelson, D.H.W, Sommers, L. E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In D. R. K. Page, R.H. Miller (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, (pp. 539–580). Madison, Wisconsin USA.
- Nie, M., Wang, Y., Yu, J., Xiao, M., Jiang, L., Yang, J., et al. (2011). Understanding Plant-Microbe Interactions for Phytoremediation of Petroleum-Polluted Soil. *PLOS ONE*, 6(3), e17961. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017961>
- Obire, O., & Anyanwu, E. (2009). Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. *Anyanwu Int. J. Environ. Sci. Tech*, 6(2), 211–218. <https://doi.org/10.1007/BF03327624>
- Ong'ondo, G. O., Yasindi, A. W., Oduor, S. O., Jost, S., Schagerl, M., Sonntag, B., & Boenigk, J. (2013). Ecology and community structure of ciliated protists in two alkaline-saline Rift Valley lakes in Kenya with special emphasis on *Frontonia*. *Journal of Plankton Research*, 35(4), 759–771. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbt044>
- Panchenko, L., Muratova, A., & Turkovskaya, O. (2017). Comparison of the phytoremediation potentials of *Medicago falcata* L. And *Medicago sativa* L. in aged oil-sludge-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 3117–3130. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8025-y>
- Parada-Albarracín, J. A., Erez, J. P., & Omez, M. A. G. (2017). Bioindicator value of flagellates in urban wastewater treatment using membrane bioreactors. *Water Research*, 122, 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.033>
- Parales, R. E., & Ditty, J. L. (2017). Substrate Transport. *Cellular Ecophysiology of Microbe*, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20796-4_44-1
- Patterson, D. J. (1996). *Free-living freshwater protozoa : a colour guide*. Wiley. <https://www.wiley.com/en-jp/Free+Living+Freshwater+Protozoa%3A+A+Colour+Guide-p-9781874545408>. Accessed 17 June 2019
- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9/FIGURES/2>
- Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z., & Zhang, Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2–3), 1490–1496. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.03.036>
- Pereira e Silva, M. C., Poly, F., Guillaumaud, N., van Elsas, J. D., y Salles, J. F. (2012). Fluctuations in ammonia oxidizing communities across agricultural soils are driven by soil structure and pH. *Frontiers in Microbiology*, 3(MAR), 77. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00077/BIBTEX>
- Phillips, L. A., Greer, C. W., Farrell, R. E., & Germida, J. J. (2012a). Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 52, 56–64.

- <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2011.10.009>
- Phillips, L. A., Greer, C. W., Farrell, R. E., & Germida, J. J. (2012b). Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, *52*, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.009>
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
- Poniewozik, M., Zięba, E., Sajnaga, E., Poniewozik, M., Zięba, E., & Sajnaga, E. (2018). Envelope development and variation in *Trachelomonas hispida* (Euglenophyta). *Algae*, *33*(4), 305–318. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2018.33.11.9>
- Pourbabaee, A. A., Khazaei, M., Alikhani, H. A., & Emami, S. (2021). Root nodulation of alfalfa by *Ensifer meliloti* in petroleum contaminated soil. *Rhizosphere*, *17*, 100305. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2021.100305>
- Rezek, J., in der Wiesche, C., Mackova, M., Zadrazil, F., & Macek, T. (2008). The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere*, *70*(9), 1603–1608. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.08.003>
- Risse-Buhl, U., & Küsel, K. (2009). Colonization dynamics of biofilm-associated ciliate morphotypes at different flow velocities. *European Journal of Protistology*, *45*(1), 64–76. <https://doi.org/10.1016/J.EJOP.2008.08.001>
- Robertson, S. J., McGill, W. B., Massicotte, H. B., & Rutherford, P. M. (2007). Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews*, *82*(2), 213–240. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00012.x>
- Rønn, R., McCaig, A. E., Griffiths, B. S., & Prosser, J. I. (2002). Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and environmental microbiology*, *68*(12), 6094–105. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6094-6105.2002>
- Rykiel, E. J. (1985). Towards a definition of ecological disturbance. *Austral Ecology*, *10*(3), 361–365. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1985.tb00897.x>
- Saleem, M., Fetzer, I., Dormann, C. F., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2012). Predator richness increases the effect of prey diversity on prey yield. *Nature Communications*, *3*(1), 1305. <https://doi.org/10.1038/ncomms2287>
- Saleem, M., Fetzer, I., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2013). Diversity of protists and bacteria determines predation performance and stability. *The ISME Journal*, *7*(10), 1912–1921. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.95>
- Salehi-Lisar, S. Y., & Deljoo, S. (2015). The physiological effect of fluorene on *Triticum aestivum*, *Medicago sativa*, and *Helianthus annuus*. *Cogent Food & Agriculture*, *1*(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1020189>
- Salt, D. E., Smith, R. D., & Raskin, I. (1998). PHYTOREMEDIATION. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>, *49*, 643–668. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.49.1.643>
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., & Uchiyama, H. (2001). A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters* *23:15*, *23*(15), 1205–1208. <https://doi.org/10.1023/A:1010517117046>
- Seyler, L. M., Tuorto, S., McGuinness, L. R., Gong, D., & Kerkhof, L. J. (2019). Bacterial

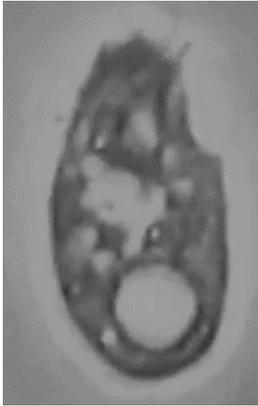
- and Archaeal Specific-Predation in the North Atlantic Basin. *Frontiers in Marine Science*, 6, 555. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2019.00555/BIBTEX>
- Shahi, A., Aydin, S., Ince, B., & Ince, O. (2016). Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 306, 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.07.016>
- Sheridan, C., Depuydt, P., De Ro, M., Petit, C., Van Gysegem, E., Delaere, P., et al. (2017). Microbial Community Dynamics and Response to Plant Growth-Promoting Microorganisms in the Rhizosphere of Four Common Food Crops Cultivated in Hydroponics. *Microbial Ecology*, 73(2), 378–393. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0855-0>
- Shimano, S., Sambe, M., & Kasahara, Y. (2012). Application of Nested PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) for the Analysis of Ciliate Communities in Soils. *Microbes and Environments*, 27(2), 136–141. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME11287>
- Shirdam, R., Zand, A. D., Bidhendi, G. N., & Mehrdadi, N. (2008). Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. *Phytoprotection*, 89(1), 21–29. <https://doi.org/10.7202/000379AR>
- Siciliano, S. D., & Germida, J. J. (1997). Bacterial inoculants of forage grasses that enhance degradation of 2-chlorobenzoic acid in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(6), 1098–1104. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620160602>
- Stoeck, T., & Edgcomb, V. (2010). Role of Protists in Microbial Interactions with Hydrocarbons. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 2423–2434). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_178
- Storey, S., Ashaari, M. M., Clipson, N., Doyle, E., & De Menezes, A. B. (2018). Opportunistic bacteria dominate the soil microbiome response to phenanthrene in a microcosm-based study. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 2815. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02815/BIBTEX>
- Sugiyama, A., Ueda, Y., Zushi, T., Takase, H., & Yazaki, K. (2014). Changes in the Bacterial Community of Soybean Rhizospheres during Growth in the Field. *PLoS ONE*, 9(6), e100709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100709>
- Tang, J., Wang, R., Niu, X., & Zhou, Q. (2010). Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. *Soil and Tillage Research*, 110(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2010.06.010>
- Tardif, S., Yergeau, É., Tremblay, J., Legendre, P., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2016). The willow microbiome is influenced by soil petroleum-hydrocarbon concentration with plant compartment-specific effects. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1363. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01363/BIBTEX>
- Trap, J., Bonkowski, M., Plassard, C., Villenave, C., & Blanchart, E. (2016). Ecological importance of soil bacterivores for ecosystem functions. *Plant and Soil*, 398(1–2), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2671-6>
- Triemer, R. E. (1997). FEEDING IN PERANEMA TRICHOPHORUM REVISITED (EUGLENOPHYTA)1. *Journal of Phycology*, 33(4), 649–654. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00649.x>
- Urakawa, H., Rajan, S., Feeney, M. E., Sobczyk, P. A., & Mortazavi, B. (2019). Ecological

- response of nitrification to oil spills and its impact on the nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*, 21(1), 18–33. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14391>
- Vaerewijck, M. J. M., Sabbe, K., Baré, J., & Houf, K. (2008). Microscopic and Molecular Studies of the Diversity of Free-Living Protozoa in Meat-Cutting Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5741–5749. <https://doi.org/10.1128/AEM.00980-08>
- Véra, A., Desvillettes, C., Bec, A., & Bourdier, G. (2001). Fatty acid composition of freshwater heterotrophic flagellates: An experimental study. *Aquatic Microbial Ecology*, 25(3), 271–279. <https://doi.org/10.3354/AME025271>
- Verni, F., & Gualtieri, P. (1997). Feeding behaviour in ciliated protists. *Micron*. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(97\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(97)00028-0)
- Walker, G., Dacks, J. B., & Martin Embley, T. (2006). Ultrastructural Description of *Breviata anathema*, N. Gen., N. Sp., the Organism Previously Studied as “*Mastigamoeba invertens*.” *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(2), 65–78. <https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.2005.00087.X>
- Watt, M., Silk, W. K., & Passioura, J. B. (2006). Rates of Root and Organism Growth, Soil Conditions, and Temporal and Spatial Development of the Rhizosphere. *Annals of Botany*, 97(5), 839. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCL028>
- Wei, R., Ni, J., Li, X., Chen, W., & Yang, Y. (2017). Dissipation and phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly spiked and long-term field-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), 7994–8003. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-8459-X/TABLES/6>
- Xu, J. G., & Johnson, R. L. (1997). Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Canadian Journal of Soil Science*, 77(3), 453–458. <https://doi.org/10.4141/S96-046>
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Frontiers in Plant Science*, 11, 359. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00359/XML/NLM>
- Yu, T., Liu, X., Ai, J., Wang, J., Guo, Y., Liu, X., et al. (2022). Microbial community succession during crude oil-degrading bacterial enrichment cultivation and construction of a degrading consortium. *Frontiers in Microbiology*, 13, 4457
- Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V. (2017). Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, 172, 120–126. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.12.038>
- Zhang, M. M., Wang, N., Hu, Y. B., & Sun, G. Y. (2018). Changes in soil physicochemical properties and soil bacterial community in mulberry (*Morus alba* L.)/alfalfa (*Medicago sativa* L.) intercropping system. *MicrobiologyOpen*, 7(2). <https://doi.org/10.1002/mbo3.555>
- Zuzolo, D., Guarino, C., Tartaglia, M., & Sciarrillo, R. (2021). Plant-Soil-Microbiota Combination for the Removal of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH): An In-Field Experiment. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3611. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621581>

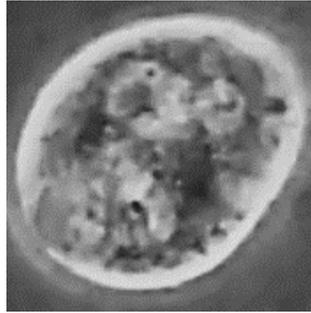
Anexo 1

Flagelados y ciliados de los microcosmos con petróleo (SP y SPM). (Microscopía de contraste de fases 40X).

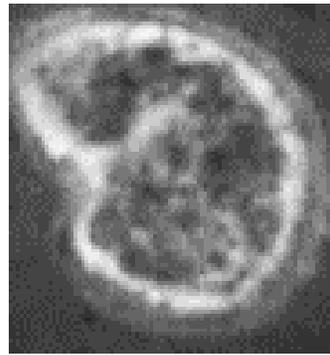
Ciliados



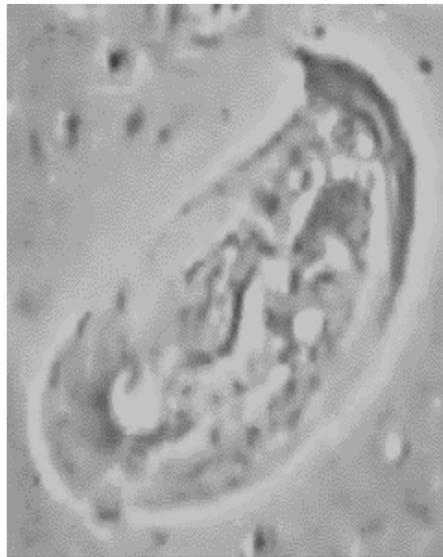
Platyoprya sp.1



Colpoda sp.1

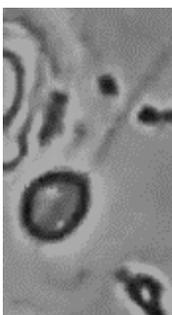


Colpoda cucullus



Trithigmastoma sp

Flagelados



Cercomonas sp.1



Spumella-like



Neobodo caudatus

10 μ

Anexo 2

Recovery of Soil Protozoan Community Structure Promoted by *M. sativa* After a Strong Pulse of Hydrocarbon Contamination

Water Air Soil Pollut (2020) 231:283
<https://doi.org/10.1007/s11270-020-04618-7>



Recovery of Soil Protozoan Community Structure Promoted by *M. sativa* After a Strong Pulse of Hydrocarbon Contamination

Laura Mondragón-Camarillo ·
Salvador Rodríguez Zaragoza ·
Ma. Remedios Mendoza-López ·
Nathalie Cabirol · Miroslav Macek

Received: 6 December 2019 / Accepted: 23 April 2020
© Springer Nature Switzerland AG 2020

Abstract The response of soil microbiota to hydrocarbon contamination has been studied normally several months after the event. However, as those studies represent a “long-term” context for microbial processes, since protozoa succession can be achieved after 28 days, we wonder how fast does trophic structure of ciliates and flagellates recover from a strong pulse of petroleum contamination under the influence of *Medicago sativa*. We hypothesized that the root effect of *M. sativa* would promote faster recovery of the protozoan trophic

structure, in comparison with the level reached in unplanted microcosms. The abundances of individuals, species, and trophic groups of ciliates and flagellates were determined at 1, 7, 14, and 30 days after a single pulse of 50,000 ppm of light petroleum on soil microcosms unplanted and planted with *M. sativa*, and their respective controls. Protozoan diversity and trophic groups were strongly reduced immediately after the pulse of contamination. Ciliates and flagellate trophic diversity increased steadily in all microcosms after 7 days. However, unplanted contaminated and planted contaminated microcosms remained the poorest communities and reached full recovery of trophic groups after 30 days. Also, the protozoan communities were segregated into 2 groups: the first from petroleum and the second formed by non-polluted microcosms. These results suggest that petroleum is a strong selection factor leading to an alternative protozoan community composition and the root effect of *M. sativa* promotes faster recovery of ciliate and flagellate communities after a devastation produced by a strong pulse of petroleum contamination.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11270-020-04618-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Mondragón-Camarillo (✉) · S. R. Zaragoza
Laboratorio de Microbiología, UBIPRO, FES-Iztacala UNAM,
Av. de los Barrios #1 Col. Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla
de Baz, México, México
e-mail: zombo_7@yahoo.com.mx

M. R. Mendoza-López
SARA, Universidad Veracruzana, Av. Dr. Luis Castelazo s/n, Col.
Industrial-Ánimas, 91000 Xalapa, Veracruz, Mexico
e-mail: remendoza@uv.mx

N. Cabirol
Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de
Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad
Universitaria, Ciudad de México, México
e-mail: nathalie.cabirol@ciencias.unam.mx

M. Macek
UIICSE, FES-Iztacala UNAM, Av. de los Barrios #1 Col. Los
Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla de Baz, México, México
e-mail: mirek@campus.iztacala.unam.mx

Keywords Soil protozoan community · Hydrocarbon
contaminations · *M. sativa* · Community restructuration

1 Introduction

Petroleum spills are important sources of soil contamination, occurring frequently during either their

Published online: 01 June 2020

Springer

extraction, refinement, or transportation. This contamination changes the physical and chemical properties of soil and consequently negatively affects plant growth by inhibiting the development of their associated microbial communities (Das and Chandran 2011; Van Hamme et al. 2003). The severity of negative effects on biota depends on the frequency, duration, and intensity of the contamination pulses and how vulnerable are soil microorganisms to hydrocarbons (Robertson et al. 2007). Oil spills simplify microbial communities by the elimination of sensitive species and strong reduction of nutrient availability; thus, the ability of microbial communities for recovering their structure and functions will depend on the pollutant's concentration in their environment.

The wide range of carbon substrates conforming the hydrocarbon mixture may facilitate the development of bacteria and fungi capable of using them as carbon sources (Van Hamme et al. 2003). However, low molecular weight hydrocarbons, such as polycyclic aromatics (PAHs), can be toxic for many bacterial species, reducing their populations and diversity. Nonetheless, several species of soil bacteria belonging to the *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, and *Variovorax* genera have been found to feed on different types of low molecular weight hydrocarbons (Aislabie et al. 2004; Hamamura et al. 2006; Saul et al. 2005), starting the process of biotic soil recovery.

Plants have also been widely used to extract, sequester, or detoxify different contaminants from soil (Kuiper et al. 2004; Pilon-Smits 2005). In the last case, root exudation enhances microbial activity that can metabolize hydrocarbons (Anderson et al. 1993) along the growing roots (Chen et al. 2007; Phillips et al. 2012). *Medicago sativa* is a fast-growing legume widely used for remediation of hydrocarbons in soils because of its extensive root system and its association with nitrogen-fixing bacteria (Agnello et al. 2016) allowing plants grow in an environment with a diminished nitrogen supply due to the excess of carbon. Consequently, these plants also facilitate the growth of other plants by easing the edaphic stress produced by hydrocarbons (Graj et al. 2013).

Introduction of newly fixed nitrogen may start counterbalancing the excess of carbon and, after contaminants have been transformed into microbial biomass, nutrient mobilization will be carried out by microbial predators. Protozoa release nutrients sequestered in bacterial biomass as a byproduct of predation, speeding up carbon mineralization as well as their reincorporation in the nutrient cycle (Clarholm 1981; Finlay et al. 2000).

Protozoa are also predators of other organisms such as fungi (fungivores), algae (algorivorous), organic particles, or dissolved organic matter (osmotrophs) and feed even on other protozoa or metazoans (Coûteaux and Darbyshire 1998; Vaerewijck et al. 2008). In turn, soil protozoa are preyed upon by larger soil dwellers, playing the very important role of being a complementary source of nutrients and energy to upper levels of the soil's trophic webs. Both metabolization and mineralization of hydrocarbons depend to a large extent on the web of trophic interactions among several types of soil microorganisms (Lara et al. 2007a).

The main objective in phytoremediation is to investigate the potential degradation of hydrocarbons by plants and their associated microorganisms within the rhizosphere in response to soil contamination in the long term (Muratova et al. 2003; Wei et al. 2014, 2014). However, microbial communities (including microbial Eukaryotes) substantially change in short periods of time in response to hydrocarbon contamination (Dubinsky et al. 2013). Based on this, we wonder how fast the structure of soil ciliates and flagellates recovers under the influence of *Medicago sativa*, after a strong pulse of petroleum contamination. We expected the structure of the ciliate and flagellate communities to fully recover from oil contamination in soil planted with *M. sativa* by the 30th day.

2 Materials and Methods

Soil was collected from a corn field with no history of petroleum contamination in Tultitlan Estado de Mexico. The soil texture was clay loam (50% sand, 26% clay, 24% silt), with the following chemical values before experimentation: 7.62 pH, 7.99% organic matter, 3.16 mg kg⁻¹ NH₄, 2.05 mg kg⁻¹ NO₃, and 4.63 mg kg⁻¹ available orthophosphates.

2.1 Microcosm Experiment Design

Forty-two microcosms containing 1 kg of soil were randomly assigned to each of the 4 working groups: the control group (S) included only the soil, without any plant and without petroleum; the treatment with *Medicago sativa* (SM) included 50 seeds of this plant sown at 4 mm depth in petroleum-free soil on day 0; the treatment of petroleum-contaminated soil (SP) included only the soil with 50,000 ppm of light petroleum, kindly

donated by authorities of the Tula Hidalgo refinery; and the 4th treatment (SPM) included soil contaminated with 50,000 ppm light petroleum + 50 seeds of *M. sativa* sown at 4 mm depth. Each treatment was set up to be analyzed with 24 h of separation from each other, starting with (S), then (SM), followed by (SP) and (SPM).

All microcosms were kept in greenhouse conditions with an average temperature of 23 °C and relative humidity of 70% without photoperiod control. Soil humidity of the microcosms was kept at 60% of the field capacity by adding sterile water every day. The amount of water to be supplemented was determined by the weight difference of the microcosms: weight at day 1 (P1) – weight after 24 h (P2) = amount of water to be supplemented every day to recover the desired 60% of the field capacity of soil under greenhouse conditions.

Once the microcosms were assigned to the control and experimental groups, three microcosms of the control (S) and 3 of the soil with petroleum (SP) were randomly chosen to perform the protozoa extraction after 24 h. Physical, chemical, and biological analyses were carried out right after sampling and microcosms were discarded thereafter. Only 3 microcosms of S and 3 of SP were processed, because there was no plant effect on the microbiota as *M. sativa* seeds had not germinated at this time (SM and SPM).

Three microcosms were processed per treatment (12 microcosms) per sampling date and were discarded after use as described above. Thus, we have 2 treatments and 2 controls, with 3 replicates each one for the remaining sampling dates (Fig. 1).

Sampling dates were scheduled at 7, 14, and 30 days to explore the development of ciliate and flagellate communities in the short term. Doubling the time between samplings was based on the non-linear development of the protozoan community along successional time (Bamforth 1992). This time separation between sampling dates aided a better exploration of early changes in the protozoan community development due to exposure to oil and its improvement by plant development in contaminated soils. Also, the experiment was set up to analyze the species richness of 3 replicates from one treatment in 1 day, allowing to fulfill the analysis of the 4 treatments during the week of sampling dates.

2.2 Soil Pollution

Petroleum was gradually added to soil and mechanically stirred to get a homogeneous mixture of 50,000 ppm

(50 g/kg). This mixture was then left to evaporate for 24 h and subsequently was brought to 60% of the field capacity with sterile distilled water.

2.3 Determination of Protozoan Species Richness

A species accumulation curve was used to determine the volume of soil that would allow comparison of the highest species richness of ciliates and flagellates between microcosms. We consecutively processed 10 samples of 10 g of soil to obtain the accumulated presence of species in 100 g of soil. Thereafter, the PC-ORD© rarefaction algorithm was run (see 6 for Windows©) and a sample size of 40 g for each microcosm was established to reach 80% of the ciliate and flagellate communities (Fig. 2). During each sampling date, 4 batches of 10 g each (40 g) were processed for every microcosm.

Protozoan diversity was determined by a modified method of a saturated but not flooded Petri dish (Bamforth 1992); 10 g of soil was placed in the Petri dish and 10 ml of distilled water was added. Water was drained off soil gently pressing with fingers. This runoff containing the protozoa was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. All sediments were examined after centrifugation (approximated 100 µl per plate) in a phase contrast microscope, and each morphotype of ciliates and flagellates was recorded. All the microcosms were checked during the same day of extraction and represented the fraction of active protozoa in soil at the time of sampling.

Ciliates and flagellates were observed alive at × 100–1000 magnification. Also, videos of their movements were taken to help with their morphological identification based on taxonomic keys (Foissner 1993; Jeuck and Amdt 2013; Lee et al. 2000; Patterson 1996). Morphological species identification allowed determining the trophic groups of most of ciliates and flagellates according to their dietary habits as reported in the literature. These protozoa were grouped into the following preferences: bacterivores (B), osmotrophs (Os), omnivores (O), predators—those that feed on other protozoa (P), autotrophs (Au), fungivores-bacterivores (F, B), and algivorous (Al).

2.4 Determination of Organic Matter, Nitrates, Nitrites, and Orthophosphates

The total organic matter was quantified by the Walkley and Black method of oxidation with potassium dichromate (Nelson and Sommers 1982). The concentration of

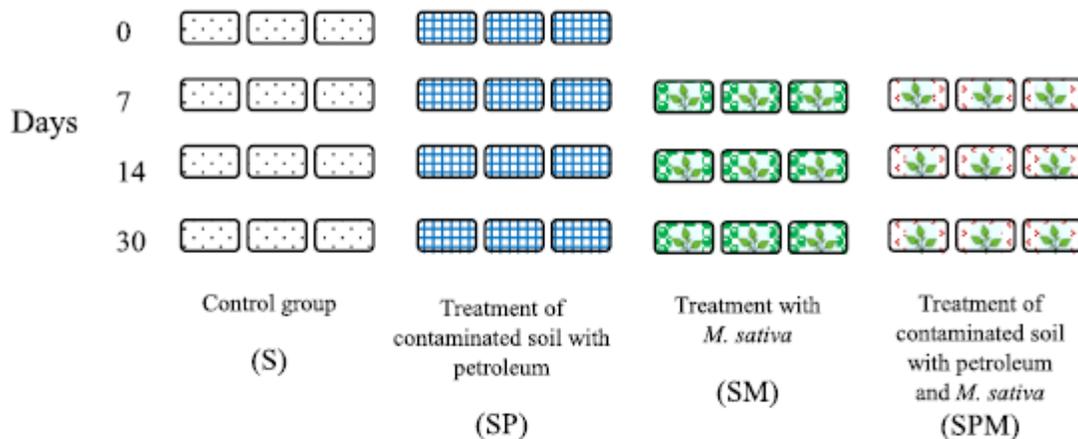


Fig. 1 Microcosm experiment setup: 46 microcosms were set up and 12 units were randomly assigned to the control group containing only soil (S) and watered to keep 60% soil humidity, 12 units

unplanted contaminated soil (SP), 9 units of soil seeded with *M. sativa* (SM), and 9 units with contaminated soil with *M. sativa* (SPM)

extractable nitrate (NO_3) and ammonium (NH_4) was determined by colorimetry from soil extracts made with 2 M KCl. NH_4 was registered at 540 nm and NO_3 at 410 nm (Foster 1995). The quantification of orthophosphates in soil extract was carried out by colorimetry at 640 nm (Bray and Kurtz 1945).

Hydrocarbon extraction was achieved by duplicate from soil samples that were frozen on each sampling day (at days 0, 7, 14, and 30). After being thermally equilibrated at room temperature, 2 ml of hexane (HPLC degree) was added to 1-g soil sample, kept in continuous agitation for 30 min to separate the organic phase. This procedure was repeated thrice, and the hexane extract

was dried with anhydrous NaSO_4 and filtered. This fraction was evaporated under reduced pressure prior to injecting into a gas chromatography. We used the gas chromatograph apparatus Agilent Technologies™, model 6890 N (Net Work GC system) equipped with a column DB-5, 5% phenyl-methyl polysiloxane (Agilent Technologies), 60 m long, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 μm film thickness (Cortés-Pérez et al. 2014).

2.5 Calculations and Statistical Analysis

An analysis of variance was made for each one of the chemical parameters (organic matter, nitrates, nitrites,

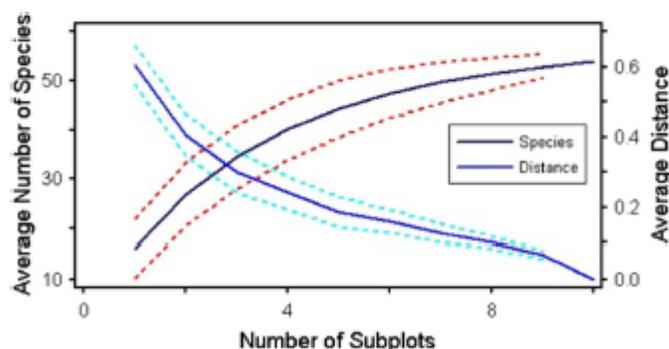


Fig. 2 Species accumulation curve. The rarefaction algorithm in PC-ORD© (ver. 6 for Windows©) was used to calculate the appropriate soil volume to sample most of the ciliate and flagellate communities from this soil before contamination with petroleum. The log-normal curve is the theoretical projection of the species richness increase as a function of the increasing soil volume, and

the above and below dotted line denotes the variance of species richness. The hyperbolic line represents the species still missing to achieve 100% of the species census, and the dotted lines denote the level of uncertainty (Cortés-Pérez et al. 2018). Based on this analysis, 40 g of soil was as the optimal sample size to obtain around 80% of the species in the microcosms

orthophosphates, and hydrocarbons), and the Tukey test was performed to point out which treatments were different. The species richness and their abundances were compared with the chi-square test. The Sørensen similarity index was calculated based on their abundances by using the software PC-ORD® ver. 6 for Windows® (Table supplementary data), and Shannon (H') and Simpson (1/D) diversity indexes were calculated. A canonical correlation analysis was carried out between the protozoan community and the chemical parameters.

3 Results

Organic matter values were very similar between the microcosms without petroleum with the plant (SM) and without plant (S) and did not present significant differences along the 30 days. In contrast, and due to hydrocarbon addition, the SP and SPM microcosms had twice the content of organic matter than the one found in the microcosms without petroleum, but there was no significant difference between contaminated microcosms SP and SPM (Table 1).

Nitrate content in the non-contaminated microcosms S and SM was significantly higher ($P < 0.01$) than the one found in contaminated ones. In these microcosms, the concentration of nitrates increased through 30 days and remained constant in the microcosms with petroleum during the same period (Table 1). Ammonium showed a different dynamic, the highest concentrations were recorded at time 0, and there was a significant reduction of this molecule in all microcosms along 7, 14, and 30 days, although ammonium concentration was slightly higher in treatments without petroleum (Table 1). Microcosms without petroleum (S and SM) showed similar orthophosphate values, while microcosms with petroleum showed a significant decrease of the available phosphorus (Table 1).

3.1 Community Structure

We identified 76 species of protozoa in all microcosms, belonging to 49 genera and 42 families (supplementary information). *Bodo*, *Cercomonas*, *Colpoda*, *Spumella*, and *Tetrahymena* were the genera representing the highest abundance in all microcosms.

Only 3 species of protozoa survived 24 h after the pulse of contamination: *Colpoda steinii*, *Spumella dangeardii*, and *Spumella socialis* (SP time 0), while

in the control (S), we found 14 species after 24 h (Fig. 3).

Species richness and abundance increased throughout the 30 days in all microcosms (Figs. 3a, b and 4). The abundance of individuals by species showed a similar tendency. Only species abundance was significantly different ($P < 0.01$) between control soil and the soil with petroleum.

3.2 Communities at the 30th Day

Control soil microcosms (S) accumulated 46 species along 30 days, which belonged to 33 genera and 30 families. These microcosms contained the lowest number of individuals. The most abundant species were *Bodo saltans*, *Colpoda steinii*, *Spumella cylindrica*, and *Spumella dangeardii*.

The microcosms of soil with petroleum (SP) showed 33 species along the 30 days, belonging to 16 genera and 12 families. This treatment was the one with the poorest species richness, but with the highest abundance of individuals of all the treatments. The most abundant species were *Bodo caudatus*, *Cercomonas* sp1, *Colpoda cucullus*, *Colpoda inflata*, *Colpoda steinii*, *Heteromita* sp., *Protaspis gemmifera*, *Spumella cylindrica*, *Spumella dangeardii*, *Spumella socialis*, and *Platyoprya* sp2.

The microcosms of planted soil (SM) showed the highest richness, accumulating 50 species along the 30 days. These species were grouped into 37 genera and 35 families. The most abundant species were *Bodo caudatus*, *Colpoda cucullus*, *Colpoda steinii*, *Goniomonas truncata*, *Spumella cylindrica*, *Spumella dangeardii*, *Spumella socialis*, and *Trithigmostoma* sp.

The microcosm of contaminated soil planted with *M. sativa* (SPM) scored second in species richness (38 species), grouped in 23 genera and 20 families. The most abundant species were *Bodo caudatus*, *Cercomonas* sp1, *Colpoda cucullus*, *Colpoda inflata*, *Colpoda steinii*, *Spumella cylindrica*, *Spumella dangeardii*, and *Spumella socialis*.

Communities of protozoa developed in contaminated soils were more similar to each other than communities found in petroleum-free treatments. There were 13 exclusive protozoan species in non-contaminated treatments throughout the 30 days. Meanwhile, flagellates *Bodo* sp3 and *Cercomonas crassicauda* were exclusively found in the petroleum treatments, while *Chlamydomonas* sp., *Halteria* sp., *Leptopharynx* sp.,

Table 1 Chemical analysis soil in microcosms. Control group (S); unplanted contaminated soil (SP); soil seeded with *M. sativa* (SM); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days. Organic matter % (OM). Number of replicates ($n = 3$)

Treatments	n	Ammonium (mg kg^{-1})	Nitrates (mg kg^{-1})	Phosphorus (mg kg^{-1})	OM %
S0	3	3.16 ± 0.57	2.05 ± 0.21	4.63 ± 0.94	7.99 ± 0.85
S7	3	1.34 ± 0.18	2.42 ± 0.11	3.99 ± 0.95	7.83 ± 0.72
S14	3	1.08 ± 0.05	2.71 ± 0.12	5.19 ± 0.60	8.38 ± 1.19
S30	3	1.06 ± 0.07	3.31 ± 0.10	4.18 ± 0.56	9.4 ± 0.41
SP0	3	2.31 ± 0.09	1.83 ± 0.01	1.04 ± 0.03	15.55 ± 0.24
SP7	3	1.22 ± 0.19	2.09 ± 0.07	1.06 ± 0.05	15.39 ± 0.59
SP14	3	1.02 ± 0.14	1.92 ± 0.08	1.52 ± 0.10	15.31 ± 1.23
SP30	3	0.94 ± 0.07	2.04 ± 0.04	1.11 ± 0.05	15.15 ± 0.36
SM7	3	1.23 ± 0.20	2.77 ± 0.25	4.89 ± 1.06	8.3 ± 0.36
SM14	3	1.05 ± 0.05	2.58 ± 0.12	5.67 ± 0.27	9.48 ± 1.57
SM30	3	1.33 ± 0.33	3.13 ± 0.24	4.30 ± 0.81	8.54 ± 0.14
SPM7	3	0.92 ± 0.07	1.99 ± 0.13	1.04 ± 0.06	14.6 ± 0.24
SPM14	3	1.00 ± 0.17	2.04 ± 0.07	1.09 ± 0.10	14.29 ± 0.72
SPM30	3	0.95 ± 0.08	2.13 ± 0.14	0.98 ± 0.02	15.39 ± 0.59

and *Urostyla* sp1 were observed only in treatments with *M. sativa* (SM and SPM). Four species were only found in the treatment SP: *Cercomonas* sp3, *Cercomonas* sp4, *Protaspis gemmifera*, and *Astylozoon* sp. The ciliate *Trithigmotoma* sp. was found in treatments without petroleum (S and SM) from day 14 and found in the SPM treatment until the 30th day.

The genera *Bodo*, *Cercomonas*, *Colpoda*, and *Spumella* especially showed greater abundance in the SP and SPM treatments during the 30 days of experimentation, where they represented 75 and 70% of the retrieved ciliates' and flagellates' individuals respectively. Contrastingly, they accounted only for 53 and 56%

of the individuals in the microcosms without petroleum (S and SM) respectively.

Sørensen's analysis showed 2 clusters with more than 60% similarity. The first cluster was formed with the communities nurtured in petroleum treatments, while treatments without petroleum formed the second cluster. In addition, the protozoan community in S0 (soil 24 h after setting up microcosms) shared less than 20% likelihood to these two clusters and the strong pulse of petroleum pollution caused SP0 (soil + hydrocarbons 24 h after setting up the microcosms) to be taken as a totally external group (Fig. 5).

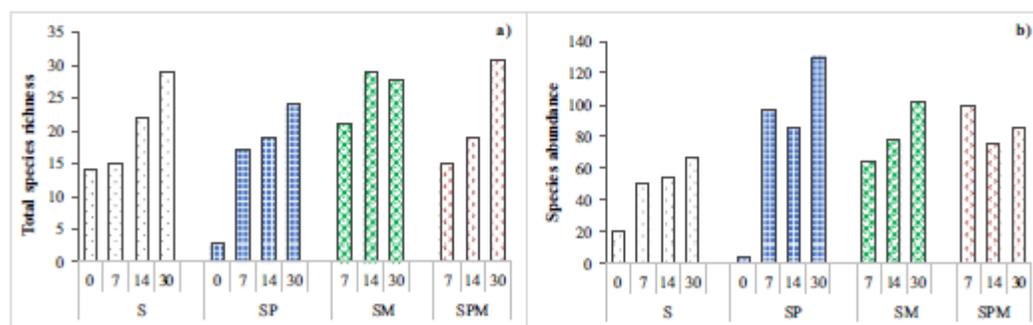


Fig. 3 a) Species richness of ciliates and flagellates detected in microcosm throughout 30 days. b) Abundance of ciliates and flagellates species. Control group (S); unplanted contaminated soil

(SP); soil seeded with *M. sativa* (SM); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days

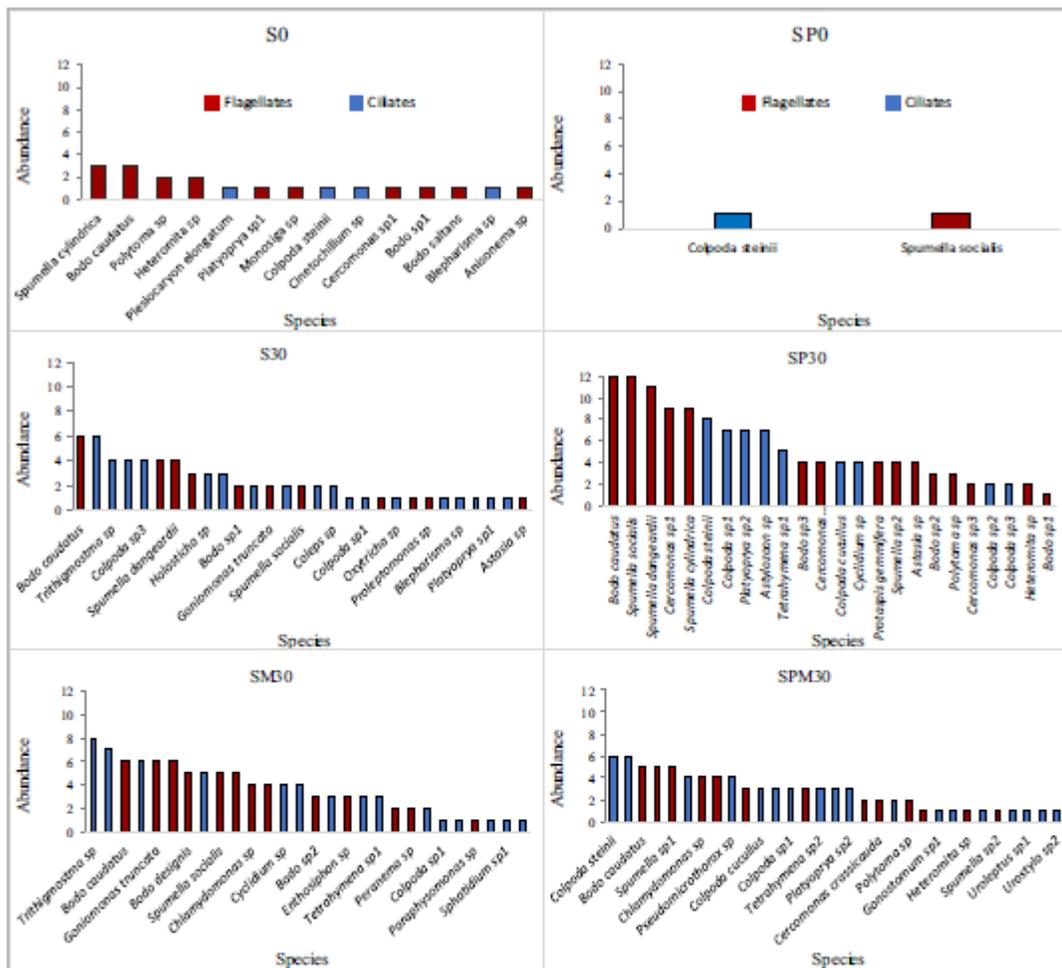


Fig. 4 Structure of ciliates and flagellates communities at time 0 and after 30 days. Control group (S); unplanted contaminated soil (SP); soil seeded with *M. sativa* (SM); contaminated soil with *M. sativa* (SPM)

3.3 Diversity Indexes

The Shannon diversity index increased over time in the following way: at time 0, the diversity was appreciably higher in the control treatment than in the SP treatment. However, the diversity approached similar values in all treatments after 7, 14, and 30 days, being the polluted soil planted with *M. sativa* the most diverse ($H' = 3.31$) (Table 2). Simpson's diversity index ($1/D$) also showed increasing values of diversity through the 30 days, with values very similar in all treatments, and again, at time 0, the diversity was significantly lower in the SP treatment

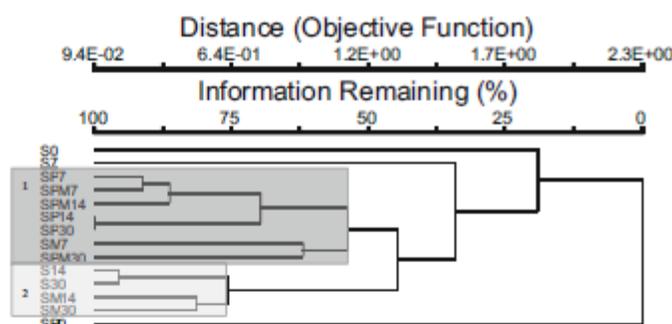
($P < 0.01$) than in the control one and remained the lowest diversity treatment throughout the 30 days (Table 2).

3.4 Trophic Groups

We found 7 trophic groups in the microcosms as a whole: bacterivores (B), osmotrophs (Os), omnivores (O), those that feed on other protozoa (P), autotrophs (Au), fungivores-bacterivores (FB), and algivorous (Al). All trophic groups were represented by more than one species.

Fig. 5 Cluster analysis of ciliates and flagellates community.

Control group (S); unplanted contaminated soil (SP); soil seeded with *M. sativa* (SM); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days



The bacterivore protozoa were the only ones with presence in all treatments during the 30 days, also showing the highest species richness. The abundance of bacterivores protozoa was the highest in the SP microcosms, followed by the SPM, SM, and S respectively (Fig. 6). The planted microcosms (SM and SPM) had a greater richness of bacterivore protozoa. Within this trophic group, the most common genera were *Bodo*, *Cercomonas*, *Goniomonas*, *Monosiga*, *Spumella*, (flagellates), *Colpoda*, *Cyclidium*, *Cyrtolophosis*, and *Tetrahymena* (ciliates).

3.5 Effects of the Pulse of Pollution on Trophic Groups

The impact of the petroleum pollution on the protozoan trophic structure was strong in the short term, as there

were only bacterivorous species (SP) 24 h after pollution. The osmotrophs were detected after 7 days and bacterivorous-fungivorous, osmotrophs, and omnivorous were very active 2 weeks after the pulse. Plant effect on this structure was evident by showing 5 of the 6 trophic groups after 30 days of contamination, in comparison with the unplanted contaminated soil that showed the same 3 trophic groups from the 14th to the 30th day (Fig. 7).

Unplanted soils showed fewer trophic groups (5) than non-contaminated planted soil. However, only the autotrophs were missing throughout the experiment (Fig. 7).

Canonical correspondence analysis identified organic matter as the leading factor for the presence of protozoan species, as it explained 11.9% of the variance. Nitrates and orthophosphates were the other two factors accounting for an additional 20% of the variance of species distribution (Fig. 8).

3.6 Total Hydrocarbons

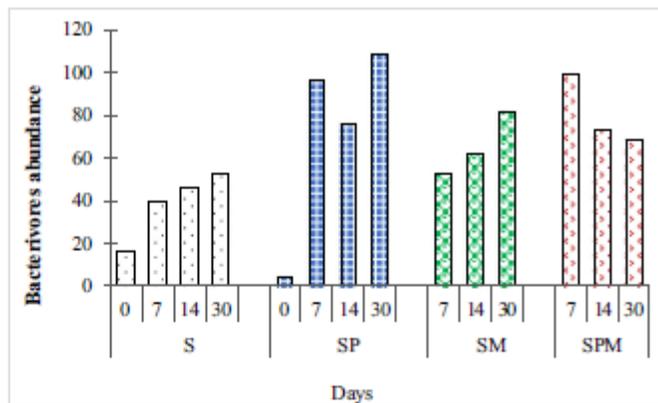
Total hydrocarbons decreased by 41% in SP and 45% in SPM after 7 days. However, after 14 days, there was an increase in the concentration of total hydrocarbons in the SPM treatment and on day 30, both contaminated microcosms showed again a further increase in the concentration of total hydrocarbons (Fig. 9).

There were 15 compounds from 12 carbons to 26 carbons (C12–C26) identified in the petroleum treatments as dodecane (C12), tridecane (C13), tetradecane (C14), pentadecane (C15), hexadecane (C16), heptadecane (C17), octadecane (C18), nonadecane (C19), eicosane (C20), heneicosane (C21), docosane (C22), tricosane (C23), tetracosane (C24), pentacosane (C25), and hexacosane (C26) (Fig. 10). In the SPM treatment, all compounds were significantly reduced

Table 2 Shannon and Simpson (1/D) diversity indexes. Control group (S); unplanted contaminated soil (SP); soil seeded with *M. sativa* (SM); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days

Treatments	Days			
	0	7	14	30
Shannon				
S	2.53	2.55	2.93	3.18
SP	1.04	2.67	3.02	3.01
SM		2.66	3.02	3.06
SPM		2.71	2.8	3.31
Simpson (1/D)				
S	11.11	11.26	16.38	20.50
SP	2.67	12.66	14.08	17.71
SM		13.16	21.12	21.49
SPM		13.37	14.51	23.38

Fig. 6 Bacterivore abundance of ciliates and flagellates communities. Control group (S); unplanted contaminated soil (SP); soil seeded with *M. sativa* (SM); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days



after 7th day ($P < 0.01$). Only compounds C13 to C22 got a significant reduction of quantity at the same time in

the SP treatments. Compounds from C14 to C26 increased their quantities after the 14th day in microcosm

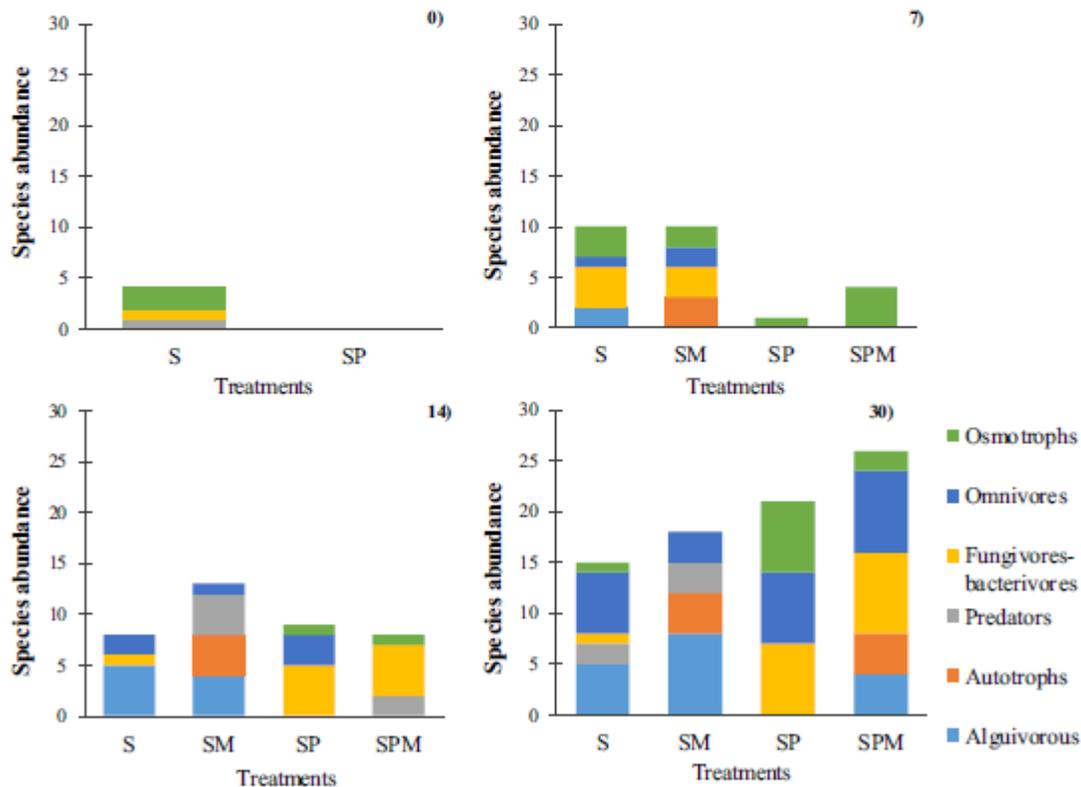


Fig. 7 Species abundance of trophic groups of the ciliates and flagellates communities detected in 30 days. Control group (S); unplanted contaminated soil (SP); soil seeded with *M. sativa* (SM);

contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days. Trophic groups: omnivores, predators (those that feed on other protozoa), autotrophs, fungivores-bacterivores, and alguivorous

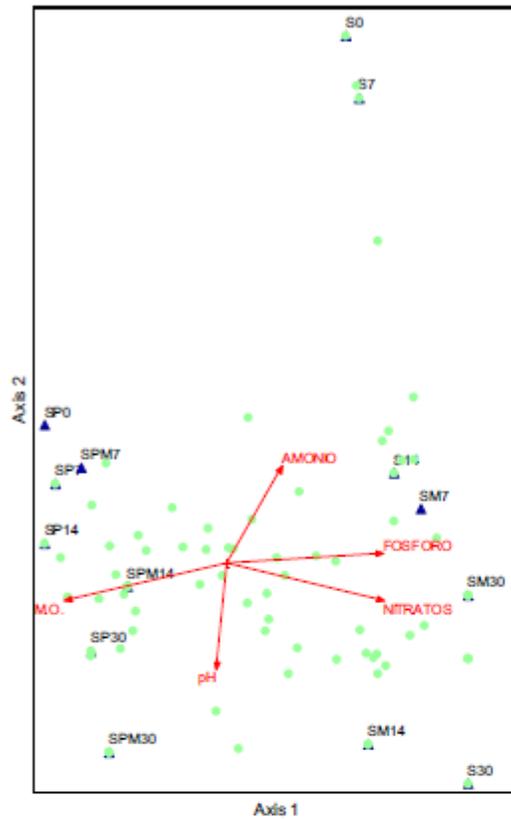


Fig. 8 Biplot of canonical correlation analysis showing the distribution of protozoan species along axes 2 and 1. Control group (S); unplanted contaminated soil (SP); soil seeded with *M. sativa* (SM); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days

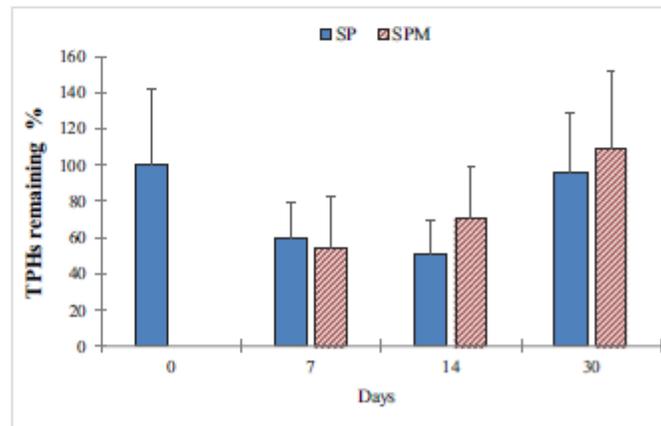
with plants (SPM) and a further increase at the 30th day in SP treatments.

4 Discussion

Little is known about how microbial communities are reestablished in the short term, after a disturbance caused by excess organic matter with little nutrient content. The significant increase in OM in the contaminated microcosms is one of the effects that petroleum causes in soil, apart from other modifications on its physical and chemical characteristics (Alrumman et al. 2015). The change in the C/N ratio was due to the excess of carbon from petroleum, which explains the significant decrease in nitrates, as microorganisms would tend to keep their N for longer (Xu and Johnson 1997). The nutrient imbalance caused by the excess of C could also drive the significant reduction of the available P in the contaminated microcosms. This sudden limitation of nutrients causes tension in the soil microbial communities, leading to changes of species composition (Zhang et al. 2018).

Petroleum had several effects on the protozoan community: first, there was an extreme simplification of this community immediately after soil contamination, since there were very few species and very few individuals. The negative effects of petroleum on microbial diversity (Alrumman et al. 2015; Girvan et al. 2005) were also true for protozoa. The decrease of species richness and abundance of protozoa could be due to a combination of two phenomena: the death of sensitive individuals and the reduction of the variety of food sources due to

Fig. 9 Remaining of total petroleum hydrocarbons. Unplanted contaminated soil (SP); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days. Standard deviation lines are shown at the top of the bars



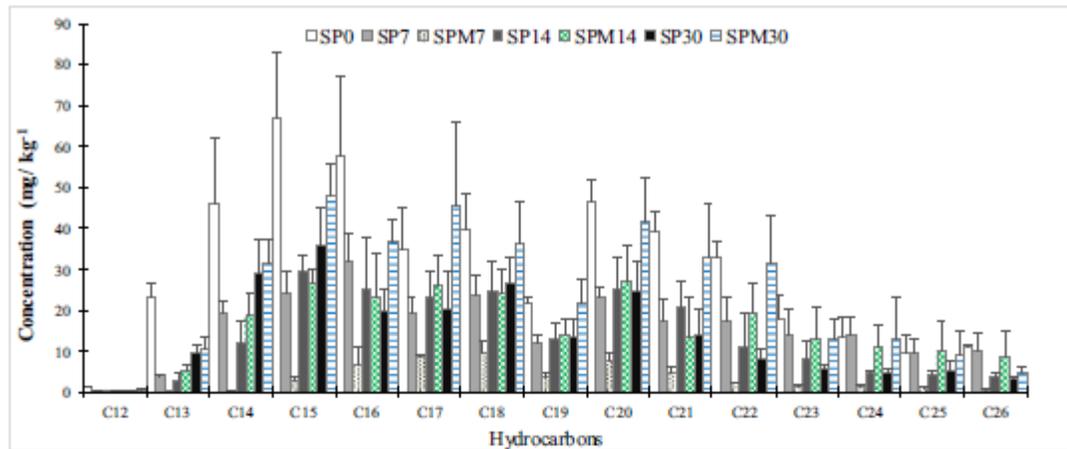


Fig. 10 Hydrocarbon concentrations from microcosms. Unplanted contaminated soil (SP); contaminated soil with *M. sativa* (SPM). 0, 7, 14, and 30 days. Standard deviation lines are shown at the top of the bars. Hydrocarbons: dodecane (C12), tridecane (C13), tetradecane (C14), pentadecane (C15),

hexadecane (C16), heptadecane (C17), octadecane (C18), nonadecane (C19), eicosane (C20), heneicosane (C21), docosane (C22), tricosane (C23), tetracosane (C24), pentacosane (C25), and hexacosane (C26)

perturbation (Rykiel 1985), which resulted in the simplification of the protozoan community.

Recovery process of protozoa started 7 days after the pulse of petroleum pollution, with an increase of species richness and the number of individuals per species. The increase of individuals is possible because bacteria able to use hydrocarbons tend to adapt quickly (Johnsen et al. 2006) and multiply in a very short time. They may become very abundant (Hamamura et al. 2006; Margesin et al. 2003) and attract surviving bacterivorous protozoa, resetting nutrient cycling.

A successional change began in all the microcosms, after water availability started the activation of protozoan community. A few very abundant species of protozoa were found during the first days after petroleum contamination and gradually, other species got integrated in the microcosms. These changes in the protozoan community were slower in the unplanted contaminated microcosms than in the non-contaminated ones. However, the influence of *M. sativa* caused the succession of species to occur faster in both conditions (contaminated and non-contaminated soil).

The presence of *M. sativa* had a positive effect on the protozoan community, as we found the highest species richness in the microcosms with petroleum planted with *M. sativa*. This effect is due to the increase of microbial activity in the root zone. Therefore, the increase in the diversity of protozoa is an indirect consequence of the

root zone effect of *M. sativa* (Bouwman and Zwart 1994; Cortés-Pérez et al. 2014; Griffiths 1990), as this plant stimulates the increase of heterotrophic and hydrocarbon-degrading bacteria, including species capable of metabolizing polycyclic aromatic hydrocarbons (Kirk et al. 2005; Muratova et al. 2003).

The simplification of protozoan community due to petroleum addition allowed the species of the *Colpoda*, *Spumella*, *Bodo*, and *Cercomonas* genera to increase their abundance. These protozoa are the most common and abundant microbial predators in soils (Domonell et al. 2013; Ekelund and Rønn 1994; Foissner 1991) and the ones that tolerated a contamination pulse of 50,000 ppm of petroleum. Consequently, these species dominated the community in the microcosms with petroleum in the first 14 days. These genera of protozoans have become characteristic of disturbed soils, including those contaminated by hydrocarbons and heavy metals (Brinch et al. 2002; Ekelund et al. 2003; Holtze et al. 2003). Probably these genera are grouping generalist species, performing very effective survival strategies. For example, the *Colpoda* genus has a strategy that can generate reproductive cysts, from which 4 to 8 ciliates may emerge, depending on the species (Lüftenegger et al. 1985). On the other hand, the population reduction of specialists can allow generalists to develop because of diminishing competition for resources.

Protozoan communities were more similar among planted treatments; however, petroleum is a strong factor selecting species including plants. The negative effect of petroleum on the germination and development of *M. sativa* seedlings (Salehi-Lisar and Deljoo 2015) may explain the 60% resemblance between SM treatments at 7 days and SPM at 30 days, meaning that it takes 3 weeks for the legume and soil microbiota to overcome the adversities caused by petroleum contamination and 30 days to show full recovery of the functioning of protozoan community. This recovery enhances the importance of redundant species' functioning in the system. Species loss due to any kind of disturbance is quite common, causing the diversity reduction within functional groups. However, redundant species ward off a complete loss of functional group, and make sure the latter to be quickly overcome if it occurred (Naem 1998).

Protozoan community got stabilized due to rare species recovery, as revealed by the Shannon index (H'), and the increasing biomass of the dominant species along the construction of the community structure took place in 30 days, as revealed by the Simpson index ($1/D$). This time frame allowed observing the development of a community structure with common and rare species, and a notorious decrease of the species that dominated during the first days after contamination. On the contrary, diversity remained high in microcosms without petroleum along the 30 days of the experiment, showing only a few species with high abundance of individuals.

4.1 Trophic Groups

Petroleum contamination immediately reduced the number of species per trophic group as well as the variety of groups. However, the root effect of *M. sativa* helped the recovery of all trophic groups of protozoa in the soil after 30 days of contamination. The recovery time of the trophic groups of ciliates and flagellates in the present study is very similar to that presented by free-living amoebas in a soil contaminated with hexane and planted with *M. sativa*, which also took 30 days in completing the recovery (Cortés-Pérez et al. 2018).

Bacterivorous protozoa are usually the most abundant in all soils (Trap et al. 2016), but in soils contaminated with petroleum, they even represent more than 90% of the protozoan community (Lara et al. 2007b; Cortés-Pérez et al. 2014). In this work, the bacterivorous

ciliates and flagellates dominated the petroleum treatments for the first 14 days, suggesting that resetting of organic matter turnover is being carried out through the bacterial pathway.

The increase of bacterivorous diversity after 14 days can be related to an increasing bacterial diversity in the microcosms with petroleum during that time (Batani et al. 2016; Saleem et al. 2013; Trap et al. 2016), allowing the development of species of bacterivorous ciliates and flagellates previously inhibited by the contamination pulse. Predators get a nutritional benefit from a diverse group of resources, since the mixture of preys better satisfy their nutritional needs (Saleem et al. 2013). This enhances greater diversity in the bacterivore trophic group which, in turn, is associated with a more efficient use of resources (Cardinale et al. 2006).

The most abundant bacterivorous protozoa in petroleum treatments were the species of *Colpoda*, *Spumella*, *Bodo*, and *Cercomonas*, which are crucial for transformation of nutrients from bacterial biomass to other levels of the soil's trophic network (Ekelund and Røn 1994). These protozoa were probably those that facilitated the presence of other species of bacteria, by releasing important nutrients already fixed in the resistant ones.

Some trophic groups of ciliates and flagellates took longer to recover, since there is a threshold of prey abundance to feed them. The low density of preys or the absence of their favorite prey can limit the ability of these protozoan populations to thrive in a polluted environment (Gast et al. 2009). Consequently, their physiological activation requires the improvement in the soil conditions enough for their preys' population to become numerous.

The elimination of the trophic groups by petroleum allowed tracking the times in which these groups began to reorganize. The osmotrophs recovered 1 week after petroleum addition; these protozoa feed on dissolved organic compounds and were possibly feeding on easily degradable low molecular weight compounds present in the hydrocarbon mixture, which is why they proliferated after 7 days.

The fungivore-bacterivore group managed to recover in the microcosms with petroleum within the first 14 days. It has been observed that petroleum generates a reduction in the diversity of fungal species and enhances the development of resistant ones (Obire and Anyanwu 2009). Probably, there were not enough fungal biomass and/or fungi species to sustain the fungivore

protozoa right after petroleum contamination, which would explain the absence of this group before 14 days.

Trophic networks were simplified after the petroleum shock to such an extent that only bacterivores remained active. The omnivores would be substituting sensitive bacterivorous species because of lack of competition, helping the reorganization of soil food web within the first 14 days and functioning as stabilizers of the trophic web (Holyoak and Sachdev 1998).

Autotrophic protozoa showed up in the petroleum-contaminated microcosm planted with *M. sativa* at the 30th day, allowing the presence of protozoa that feed on autotrophs, such as the ciliated *Trithymostoma* sp. This could be due to chelators released by plants, which increases the availability of some nutrients such as iron (Dotaniya and Meena 2015), badly needed by algae and other autotrophic protozoa to start thriving. Our results show the beneficial effect generated by the legume establishment. Such beneficial plant effect may be due to greater availability and mobility of nutrients fueling the microbial populations in the root zone and, indirectly, favoring the recovery of the trophic groups of ciliates and flagellates in the microcosm with petroleum. This recovery process with *M. sativa* is almost complete in just 1 month after the contamination pulse.

The diminishing concentration of hydrocarbons in soil can be caused by several phenomena such as photodegradation, evaporation, and bioremediation; the first two operate immediately after soil contamination (Maliszewska-Kordybach 2005). We found a sequential increase of protozoa feeding on bacteria, fungi, and algae, especially in the treatment with petroleum and *M. sativa*. Thus, hydrocarbon metabolization could participate in the increase of microbial biomass and the increase in the amount of total hydrocarbons, since the biomass of bacteria, fungi, and algae may be an important source of C10 to C25 hydrocarbons detected by the 14th day (Gennadiev et al. 2015).

5 Conclusion

The recovery of the trophic groups of ciliates and flagellates, as well as their community structure, occurred faster in the hydrocarbon-contaminated soil under *M. sativa*, than the recovery observed in the non-planted contaminated soil. *M. sativa* helped developing a taxonomic composition of the ciliate and flagellate communities after petroleum contamination, although different

from the one developed in the planted non-contaminated soil. Nonetheless, the functionality of these two communities was very similar as trophic groups got fully recovered after 30 days, while the non-planted soil plus petroleum showed no signs of having started recovery after this time.

Acknowledgments Laura Mondragón Camarillo acknowledges Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and CONACyT for their support in obtaining her doctoral degree.

References

- Agnello, A. C., Bagard, M., van Hullebusch, E. D., Esposito, G., & Huguenot, D. (2016). Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 563–564, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>.
- Aislabie, J. M., Balks, M. R., Foght, J. M. A., & Waterhouse, E. J. (2004). Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environmental Science & Technology*, 38(5), 1265–1274. <https://doi.org/10.1021/ES0305149>.
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 27, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>.
- Anderson, T. A., Guthrie, E. A., & Walton, B. T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science & Technology*, 27(13), 2630–2636. <https://doi.org/10.1021/es00049a001>.
- Bamforth, S. S. (1992). Sampling and enumerating soil protozoa. In A. T. Lee & J. I. Soldo (Eds.), *Protocols in protozoology* (p. B-5.1). Lawrence, Kansas: Allen Press.
- Batani, G., Pérez, G., Martínez de la Escalera, G., Piccini, C., & Fazi, S. (2016). Competition and protist predation are important regulators of riverine bacterial community composition and size distribution. *Journal of Freshwater Ecology*, 31(4), 609–623. <https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1209443>.
- Bouwman, L. A., & Zwart, K. B. (1994). The ecology of bacterivorous protozoans and nematodes in arable soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 51, 145–160. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90040-X).
- Bray, R. H., & Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59(1), 39–46.
- Brinch, U. C., Ekelund, F., & Jacobsen, C. S. (2002). Method for spiking soil samples with organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1808–1816. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1808-1816.2002>.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443, 989–992. <https://doi.org/10.1038/nature05202>.

- Chen, X., Liu, M., Hu, F., Mao, X., & Li, H. (2007). Contributions of soil micro-fauna (protozoa and nematodes) to rhizosphere ecological functions. *Acta Ecologica Sinica*, 27(8), 3132–3143. [https://doi.org/10.1016/S1872-2032\(07\)60068-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2032(07)60068-7).
- Clarholm, M. (1981). Protozoan grazing of bacteria in soil—impact and importance. *Microbial Ecology*, 7(4), 343–350. <https://doi.org/10.1007/BF02341429>.
- 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(2), 430–442. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0305-1>.
- Cortés-Pérez, S., Rodríguez Zaragoza, S., Ferrera-Cerrato, R., & Luna-Pabello, V. M. (2018). Recovery of amoebae community in the root soil of *M. sativa* after a strong contamination pulse with n-hexane. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(9), 293. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3944-5>.
- Coltiaux, M.-M., & Darbyshire, J. (1998). Functional diversity amongst soil protozoa. *Applied Soil Ecology*, 10(3), 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00122-X](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00122-X).
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.
- Domonell, A., Brabender, M., Nitsche, F., Bonkowski, M., & Amdt, H. (2013). Community structure of cultivable protists in different grassland and forest soils of Thuringia. *Pedobiologia*, 56(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pedobl.2012.07.001>.
- Dotaniya, M. L., & Meena, V. D. (2015). Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants: a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0297-0>.
- Dubinsky, E. A., Conrad, M. E., Chakraborty, R., Bill, M., Borglin, S. E., Hollibaugh, J. T., et al. (2013). Succession of hydrocarbon-degrading bacteria in the aftermath of the *Deepwater Horizon* oil spill in the Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology*, 47(19), 10860–10867. <https://doi.org/10.1021/es401676y>.
- Ekelund, F., Olsson, S., & Johansen, A. (2003). Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(11), 1507–1516. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00249-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00249-9).
- Ekelund, F., & Rønn, R. (1994). Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(4), 321–353. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)90068-X).
- Finlay, B. J., Black, H. I. J., Brown, S., Clarke, K. J., Esteban, G. F., Hindle, R. M., et al. (2000). Estimating the growth potential of the soil protozoan community. *Protist*, 151(1), 69–80. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00008>.
- Foissner, W. (1991). Diversity and ecology of soil flagellates. In J. Patterson, David J. Larsen (Ed.), *The biology of free-living heterotrophic flagellates* (Systematic, p. pp.93–112). Clarendon Press Oxford.
- Foissner, W. (1993). *Colpodea (Ciliophora)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Foster, J. C. (1995). Soil nitrogen. In A. Kassem & N. Paolo (Eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (pp. 79–87). Academic Press London.
- Gast, R. J., Sanders, R. W., & Caron, D. A. (2009). Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. *Trends in Microbiology*, 17(12), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.TIM.2009.09.001>.
- Gennadiev, A. N., Pikovskii, Y. I., Tsibart, A. S., & Smirnova, M. A. (2015). Hydrocarbons in soils: origin, composition, and behavior (review). *Eurasian Soil Science*, 48(10), 1076–1089. <https://doi.org/10.1134/S1064229315100026>.
- Girvan, M. S., Campbell, C. D., Källham, K., Prosser, J. I., & Glover, L. A. (2005). Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology*, 7(3), 301–313. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00695.x>.
- Graj, W., Lisiecki, P., Szule, A., Chrzanowski, L., & Wojtera-Kwiczor, J. (2013). Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224, 1676. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1676-0>.
- Griffiths, B. S. (1990). A comparison of microbial-feeding nematodes and protozoa in the rhizosphere of different plants. *Biology and Fertility of Soils*, 9(1), 83–88. <https://doi.org/10.1007/BF00335867>.
- Hamamura, N., Olson, S. H., Ward, D. M., & Inskeep, W. P. (2006). Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6316–6324. <https://doi.org/10.1128/AEM.01015-06>.
- Holtze, M. S., Ekelund, F., Rasmussen, L. D., Jacobsen, C. S., & Johnsen, K. (2003). Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa: differential effects of mercury. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(9), 1175–1181. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00178-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00178-0).
- Holyoak, M., & Sachdev, S. (1998). Omnivory and the stability of simple food webs. *Oecologia*, 117(3), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s004420050675>.
- Jeuck, A., & Amdt, H. (2013). A short guide to common heterotrophic flagellates of freshwater habitats based on the morphology of living organisms. *Annals of Anatomy*, 164, 842–860. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.08.003>.
- Johnsen, A. R., de Liphay, J. R., Sorensen, S. J., Ekelund, F., Christensen, P., Andersen, O., et al. (2006). Microbial degradation of street dust polycyclic aromatic hydrocarbons in microcosms simulating diffuse pollution of urban soil. *Environmental Microbiology*, 8(3), 535–545. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00935.x>.
- Kirk, J. L., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2005). The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, 133(3), 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.002>.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(1), 6–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.6>.
- Lara, E., Berney, C., Ekelund, F., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2007a). Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site.

- Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.06.017>.
- Lara, E., Berney, C., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2007b). Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3), 365–373. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00387.x>.
- Lee, J. J., Leedale, G. F., & Bradbury, P. C., Phyllis C. (2000). An illustrated guide to the protozoa: organisms traditionally referred to as protozoa, or newly discovered groups. Society of Protozoologists.
- Lüftenerger, G., Foissner, W., & Adam, H. (1985). r- and K-selection in soil ciliates: a field and experimental approach. *Oecologia*, 66(4), 574–579. <https://doi.org/10.1007/BF00379352>.
- Maliszewska-Kordybach, B. (2005). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly contaminated soils – the effect of soil physicochemical properties and aging. *Water, Air, and Soil Pollution*, 168(1–4), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-0940-3>.
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3085–3092. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3085-3092.2003>.
- Muratova, A., Hübner, T., Narula, N., Wand, H., Turkovskaya, O., Kusch, P., et al. (2003). Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological Research*, 158(2), 151–161. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00187>.
- Naem, S. (1998). Species redundancy and ecosystem reliability. *Conservation Biology*, 12(1), 39–45. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1998.96379.x>.
- Nelson, D. H. W., & Sommers, L. E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In D. R. K. Page & R. H. Miller (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties* (pp. 539–580). Wisconsin: Madison.
- Obire, O., & Anyanwu, E. (2009). Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. *Anyanwu Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 6(2), 211–218. <https://doi.org/10.1007/BF03327624>.
- Patterson, D. J. (1996). Free-living freshwater protozoa: a colour guide. Wiley.
- Phillips, L. A., Greer, C. W., Farrell, R. E., & Germida, J. J. (2012). Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 52, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.009>.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>.
- Robertson, S. J., McGill, W. B., Massicotte, H. B., & Rutherford, P. M. (2007). Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews*, 82(2), 213–240. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00012.x>.
- Rykiel, E. J. (1985). Towards a definition of ecological disturbance. *Austral Ecology*, 10(3), 361–365. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1985.tb00897.x>.
- Saloem, M., Fetzer, I., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2013). Diversity of protists and bacteria determines predation performance and stability. *The ISME Journal*, 7(10), 1912–1921. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.95>.
- Salehi-Lisar, S. Y., & Deljoo, S. (2015). The physiological effect of fluorene on *Triticum aestivum*, *Medicago sativa*, and *Helianthus annuus*. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1020189>.
- Saul, D. J., Aislabie, J. M., Brown, C. E., Harris, L., & Foght, J. M. (2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(1), 141–155. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.11.007>.
- Trap, J., Bonkowski, M., Plassard, C., Villenave, C., & Blanchart, E. (2016). Ecological importance of soil bacterivores for ecosystem functions. *Plant and Soil*, 398(1–2), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2671-6>.
- Vaerewijck, M. J. M., Sabbe, K., Baré, J., & Houf, K. (2008). Microscopic and molecular studies of the diversity of free-living protozoa in meat-cutting plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5741–5749. <https://doi.org/10.1128/AEM.00980-08>.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003>.
- Wei, J., Liu, X., Zhang, X., Chen, X., Liu, S., & Chen, L. (2014). Rhizosphere effect of *Scirpus triquetus* on soil microbial structure during phytoremediation of diesel-contaminated wetland. *Environmental Technology*, 35(4), 514–520. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.836549>.
- Xu, J. G., & Johnson, R. L. (1997). Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Canadian Journal of Soil Science*, 77(3), 453–458. www.nrcresearchpress.com. Accessed 6 November 2018.
- Zhang, M. M., Wang, N., Hu, Y. B., & Sun, G. Y. (2018). Changes in soil physicochemical properties and soil bacterial community in mulberry (*Morus alba* L.)/alfalfa (*Medicago sativa* L.) intercropping system. *MicrobiologyOpen*, 7(2). <https://doi.org/10.1002/mbo3.555>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.