

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---



**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**"CAMBIO DE LA COMUNIDAD DE AMEBAS DESNUDAS EN  
SUELO CONTAMINADO POR COMBUSTÓLEO EN EL MUNICIPIO  
JALACINGO, VERACRUZ"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BILOGÍA AMBIENTAL)**

**P R E S E N T A**

**SANDRA CORTÉS PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA  
MÉXICO, D. F**

**FEBRERO, 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al CONACyT por la beca recibida durante la Maestría (No. de registro de becario 203296).

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología en la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), bajo la dirección del Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza, a quien agradezco su total apoyo y orientación en torno al trabajo. De igual forma agradezco a los miembros del Comité Tutorial: al Dr. Ronald Ferrera Cerrato y al Dr. Julio Campo Alves por sus consejos durante el transcurso y culminación del trabajo, al igual que la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea (Instituto de Geología) y la Dra. Christina Désirée Siebe Grabach (Instituto de Geología) por su participación como miembros del jurado y por sus observaciones en la edición final del trabajo.

Dedico esta tesis a mis futuros hijos.....

Otros agradecimientos...

A mis padres, Guadalupe Pérez Ortiz y Armando Cortés Sandoval les agradezco el haber tenido a esa chaparrita linda (osea yo), ah!! Y por supuesto todo el apoyo financiero que me proporcionaron durante más de 20 años y sobre todo el cariño que fue, ha sido y seguira siendo una de las cosas más valiosas que poseo

Agradezco a aquel hombre que se ahorco por mi, Gonzalo, gracias por ser de las pocas personas que han confiado en mis capacidades, pero sobre todo por esa paciencia monumental que me has tenido. Además del amor que me das tan generosamente día con día y que no podré pagar con absolutamente nada más solo con mi humilde amor. ¡Eres una persona realmente fabulosa!

A mi hermosa hermana América (alías la zarigüeya) por todo lo que me adora e idolatra, por supuesto no puedo olvidar a su agraciado esposo Edgar por su amistad y sobre todo por la contribución genética proporcionada al clan y me refiero a esos seres PRECIOSOS que son mis sobrinos a los que venero y amo profundamente Hailee y Leonel (enanos del demonio)

A esos gallardos caballeros, por supuesto hablo de mis consanguíneos; Osvaldo y Pedro, les agradezco el profundo desinterés que tienen acerca de mí y de todos mis asuntos, JA JA, bueno esta bien, les doy las gracias por todo el soporte; diría que moral (pero realmente no creo que conozcan la palabra, mucho menos el concepto), y el cariño que me tienen

Por ultimo, pero no al final, le doy mi agradecimiento a los integrantes más recientes de la familia; Griselda y próximamente a mi otro sobrino el cual espero con mucha alegría y curiosidad.

A mis compañeros y amigos de Microbiología:

El primero de todos es el jefe Salvador, GRACIAS, de verdad muchas gracias por todo lo que has hecho por mí, eres una gran y extraordinaria persona. Jamás podré pagarte todo el conocimiento que me has dado, el cual apreciaré toda mi vida. Eres el mejor amigo y profesor que he conocido (eres atm)

A mis hijas "las horrendas" pertenecientes al suborden Serpentes; Laura, Candis y Ana, les agradezco todo el aliento y la amistad que me han brindado. Son excelentes compañeras de trabajo y grandes mujeres, (estoy derramando una lágrima de la ternura que me provocan). Claro ya entrados en tema de serpientes no podía faltar Angélica, la más reciente de todas

Así como al Prof. Ramón;

Al horrendo Jesús gran compañero y amigo, también a los mechudos; Daniel y Jaime "larga vida al blastoporo" o no canijos. No puedo olvidar al grandote

Abidd mi próximo hijo

Y muy recientemente a Sergio que ha engrosado las filas de este laboratorio de perdición. A todos ellos agradezco su confianza y su aprecio.

"Pero sobre todo les doy las gracias por dejarme ser su compañera y amiga dentro de este grupo que hemos formado"

Y

por supuesto a Flavio que ha sido un amigo y un fabuloso entrenador

Una mención especial a toda la banda Iztacaltense:

Arti, Tarzán, Fercho, Wallas, Karime, Chaparro, Lalo, Martín, George, por todas esas tardes bohemias

A Chucho, Gabo; Arale, Maria Elena, Toño, Samuel, Sandra, Daniela y Coca

Ah! Y a la banda CCHera

Tulio y Enrique, mis dos grandes amigos de la pubertad.....

Gracias a todos....

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<i>Objetivo general</i> .....	13
<i>Objetivos particulares</i> .....	13
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	14
Ubicación del área de estudio.....	14
Vegetación.....	14
Toma de muestras.....	16
Muestra compuesta.....	16
Estimación de número de amebas desnudas.....	16
Detección de especies.....	17
Determinación del volumen mínimo de muestra.....	18
Análisis estadístico.....	18
Modelo de la red trófica.....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	22
Año 2005.....	22
Suelo referencia (SR).....	22
Grupos tróficos del suelo referencia.....	23
Suelo contaminado (SC).....	24
Grupos tróficos en el suelo contaminado.....	24
Similitud entre comunidades (año 2005).....	25
Año 2006.....	25
Suelo referencia.....	26
Grupos tróficos suelo referencia.....	26
Suelo contaminado.....	27
Grupos tróficos del suelo contaminado.....	27
Similitud entre comunidades del segundo muestreo.....	28
Variación interanual en la composición de las comunidades de los dos años.....	28
Modelo de la red trófica.....	29
<b>DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	49
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	50
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	51
<b>ANEXO I</b> .....	60

## **RESUMEN**

La contaminación del suelo por hidrocarburos es un problema común debido a los derrames accidentales e intencionales. Lo anterior ocasiona la pérdida de productividad y la disminución de la calidad de los productos cultivados. Además, los hidrocarburos pueden ser tóxicos para algunas especies de microorganismos. La estructura de la comunidad bacteriana se altera como consecuencia de la contaminación la cual modificará la presencia de las especies de amebas, porque estas últimas son más susceptibles que las bacterias a las concentraciones de contaminantes. Existen observaciones de amebas en aguas contaminadas por hidrocarburos, pero no se ha evaluado el impacto de estos compuestos en la riqueza de especies de amebas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el cambio de la riqueza de especies de amebas de vida libre en un suelo de cultivo contaminado con combustóleo comparado con un suelo no contaminado. Los muestreos se realizaron en el mes de octubre del 2005 y octubre 2006. La cantidad de amebas determinada por el número más probable (NMP) no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). La abundancia de amebas desnudas en el suelo de cultivo no contaminado o suelo referencia (SR) fue de  $2.1 \times 10^5 (\pm 0.15)$  individuos por gramo de suelo y en el suelo de cultivo contaminado (SC) se observó una abundancia de  $6.7 \times 10^4 (\pm 0.42)$  individuos por gramo de suelo. Hubo una reducción de la riqueza de especies de amebas, identificadas por su morfología, después de la contaminación con combustóleo. En el suelo no contaminado se registraron 52 especies y en el suelo contaminado se encontraron 45 especies. En el suelo no contaminado sólo se registraron especies comunes y raras, mientras que en el

suelo contaminado aparecieron especies dominantes, comunes y raras. En el segundo año, la riqueza de especies del suelo contaminado aumentó a 33, mientras que, en el suelo no contaminado, el número de especies se redujo a 33. Se registró poca similitud entre las comunidades, la cual fue de 0.44 (2005) y 0.35 (2006). Los gremios alimentarios que dominaron en ambos suelos fueron el bacterívoro y el omnívoro. Esto indica que la contaminación pudo haber beneficiando a diferentes especies de amebas.

## ***ABSTRACT***

Soil pollution by hydrocarbons due to oil spills is a common problem in areas near oil refinery facilities. Several consequences of these spills in cultivated soils are: increased hydrophobicity, germination decline, productivity loss, and diminishes quality of cultivated products. These situations lead to modification of soil microorganisms' community as response to oil impact. Protozoa, and amoeba in particular, may be more susceptible than bacteria to pollutants because lack of cell's protective structures. Besides occasional observations of amoebae in oil-polluted water and soils, there have been no attempts to evaluate oil impact on the quantity and species richness of soil amoebae. We aim to determine the change of amoebae community in cultivated soil polluted with combustoleum. Composite samples were taken from 6 plots from contaminated and non-contaminated soil at 0 - 20 cm depth in October 2005 and October 2006. Quantity of soil amoebae was determined by most probable number (MPN) in micro titer plates and species determination was carried out by morphology after culturing 1g of soil (dw) in soil extract medium. We made 10 repetitions for each sample and performed Sørensen analysis after constructing the species list of amoebae in polluted and non-polluted soil. Numbers of amoeba were higher but nonsignificantly different ( $P > 0.5$ ) in non-polluted ( $2.1 \times 10^5 \pm 0.15$ ) than in polluted soils ( $6.7 \times 10^4 \pm 0.42$ ). Species number identified from non-contaminated soil was 52 and 45 in polluted soils. Decrease of species richness lead to dominance of bacterivorous amoebae and omnivorous ones; it changed the species

composition of the amoebae community while allowed comparable numbers of soil amoebae in polluted vs non-polluted soil. Similarity of amoeba community in polluted and non-polluted soil was 0.44 (2005) and 0.35 (2006) respectively.

# INTRODUCCIÓN

La perturbación es un factor que transforma la dinámica y la estructura de las comunidades. La estructura de una comunidad está compuesta por la diversidad de organismos, su organización en el tiempo y el espacio. También se puede analizar la organización de la agrupación de estas especies en gremios tróficos. La comunidad es una unidad estructurada, organizada y jerarquizada que se desarrolla dentro del ecosistema y está adaptada a las variaciones normales de las condiciones ambientales. Por tal razón, la comunidad puede tener variaciones en su estructura dentro de un rango normal de operación, sin alterar su funcionamiento. En otras palabras, se encuentra en un equilibrio dinámico con su ambiente (Trewavas, 2006; Pickett, *et al.* 1989; Odum, 1985 y Odum, *et al.* 1979). Muchas de estas variaciones están dictadas por los pulsos de recursos, los cuales son aportes energéticos que aprovechan los organismos en un tiempo y un espacio particular (Konopka, 2000).

Además de estas variaciones naturales, puede haber otro tipo de alteraciones como las generadas por las actividades humanas. Estas situaciones pueden cambiar por completo la estructura de las unidades fundamentales que conforman a los ecosistemas y a las comunidades (Pickett, *et al.* 1989). El efecto que tienen las perturbaciones sobre las comunidades depende de la intensidad y duración de este fenómeno. Así, tenemos que el suceso puede ser constante y de poca intensidad, constante y muy intenso, o el evento sucede solo una vez, pero con un nivel de intensidad alto. Cada caso puede repercutir de diferentes formas en la diversidad de especies. En los casos de alteraciones

intensas, la complejidad de la estructura de la comunidad sufre una disminución por la pérdida de la riqueza de especies. Sin embargo, el efecto no es homogéneo para todas ellas, pues algunas especies pueden verse beneficiadas por la perturbación (Pickett, *et al.* 1989; Odum, 1985 y Odum, *et al.* 1979).

El suelo es uno de los recursos que más se ve afectado por las diferentes prácticas humanas. Uno de los problemas es la pérdida de este recurso por el uso con fines agrícolas. El suelo pasa por varios mecanismos de transformación que producen una serie de alteraciones que modifican de manera sustancial las propiedades físicas, químicas y biológicas del sistema edáfico. La destrucción de los horizontes en el suelo genera estrés en las comunidades que se desarrollan dentro de la estructuración física del sustrato. El arado del suelo ocasiona una reestructuración por la destrucción de los macroagregados disminuyendo el espacio entre ellos, afectando la continuidad en la porosfera con el fin de evitar la pérdida de agua. Esta serie de factores están correlacionados con el cambio de la diversidad de microflora y microfauna de los suelos de cultivo (Sánchez-Moreno, 2007; Coleman, *et al.* 2002; Buckley y Schmidt, 2001).

Las alteraciones en las propiedades químicas de los suelos de cultivo, se deben principalmente a la adición de materia orgánica y/o uso frecuente de abonos, causando que las concentraciones de C (carbono), N (nitrógeno), y P (fósforo) permanezcan un periodo más largo de tiempo en el suelo. En conjunto todos estos factores alteran el funcionamiento y estructuración de la comunidad edáfica (Buckley y Schmidt, 2001). Al mantenerse constantes los

nutrientes, los efectos sobre la comunidad serán negativos y/o positivos para algunas especies de la microflora.

Las actividades petroleras generan graves problemas de contaminación, donde los suelos cercanos a la explotación de hidrocarburos se ven seriamente afectados por los derrames accidentales. El efecto de los hidrocarburos sobre las propiedades físicas y químicas no es claro todavía; sin embargo, algunos cambios en estas propiedades parecen depender de la concentración y el tipo de mezcla de hidrocarburos que llegue a adsorberse en los agregados del suelo. Los hidrocarburos modifican algunas de las cualidades del suelo tales como la textura (por que hay un aumento en la agregación de las partículas), el incremento de la concentración de materia orgánica, disminuye la densidad real y aumenta la porosidad (Martínez y López, 2001).

Una gran parte de los hidrocarburos son considerados peligrosos debido a su potencialidad como agentes tóxicos, mutagénicos y cancerígenos presentando un riesgo significativo a la salud humana y al ambiente (Menzie *et al.*, 1992; Nadon *et al.*, 1995 y <http://www.epa.gov/>). Existen otros compuestos de hidrocarburos que son vertidos a los suelos, como es el caso del combustóleo. Esta mezcla de hidrocarburos es líquida, oscura e insoluble en agua, con olor típico a petróleo. Se utiliza especialmente como combustible en hornos, secadores y calderas. También puede utilizarse para calentadores (unidades de calefacción) y en plantas de generación de energía eléctrica. Este combustible está constituido por una mezcla compleja de alcanos, asfaltenos, alquenos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos y en bajas proporciones algunos compuestos con N y S (azufre) (Philip *et al.* 1984). Los efectos tóxicos del combustóleo sobre la fisiología de animales no son claros,

sin embargo se ha reportado que los derrames marinos y en rios de este compuesto afectan a muchas especies, perjudicando a pescadores y agricultores asentados en las orillas de estos cuerpos de agua (La Jornada, 2007; EnlaceVeracruz 212, 2007). Los derrames en suelos de diferentes zonas de Veracruz suelen darse en zonas adyacentes a tuberías debido a la falta de mantenimiento (Diario de Xalapa, 2008 en <http://www.oem.com.mx>), lo que aumenta los riesgos a la salud pública. Los riesgos al ambiente son latentes (HDSS: PR-405/04) porque es fácilmente adsorbido por las partículas del suelo interfiriendo en las propiedades físicas más importantes del mismo (Martínez y López, 2001). Sin embargo, se han reportado diferentes especies vegetales que son tolerantes a la presencia de este contaminante (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Sangabriel *et al.* 2006). De la misma manera se ha observado la presencia de bacterias tolerantes o que incluso degradan algunos compuestos que forman parte de este combustible (Pineda-Flores *et al.* 2004). Estas especies bacterianas son elementos clave en la mineralización de estos compuestos recalcitrantes (Aislabie, 2000; Bouwer y Zehnder, 1993).

Existen muchas más especies con la capacidad de tolerar este tipo de sustancias. Dentro de esta encontramos eucariontes microbianos que han logrado ser identificados en sitios contaminados con petróleo. Tal es el caso de diferentes géneros de levaduras como *Phialophora* que se encontró de forma dominante en suelos contaminados de la Antártica (Aislabie *et al.* 2001), *Exophiala xenobiotica* sp que prospera en sitios contaminados con hidrocarburos (De Hoog *et al.*, 2006) o *Mortierella* sp que es capaz de alimentarse de estos contaminantes (Hughes, 2007). El estudio de los microorganismos degradadores de hidrocarburos es muy importante, porque

eliminan del sistema a los compuestos que son tóxicos para otros organismos (Ollivier y Magot, 2005; Nicoletta et al. 2005 y Zhang and Bennett, 2005). Lo anterior se ha aprovechado para la remediación de sitios que han sido contaminados (Sarkar *et al.* 2005). Sin embargo, esto parece ser sólo una parte del proceso biológico de la mineralización de este tipo de contaminantes, pues se han encontrado algunas otras especies eucariontes que se desarrollan en aguas y sedimentos contaminados con hidrocarburos, como es el caso de algunas especies de protozoos aislados de sedimentos marinos (Anderson, 2001) y en biorreactores. Los protozoos del suelo son organismos eucariontes microscópicos de una sola célula que pueden diferenciarse de manera sencilla en tres diferentes tipos morfológicos; ciliados, flagelados y amebas. Aunque estos tres grupos se encuentran en el suelo, las amebas muestran la mayor diversidad de formas en el mismo (Clarholm, 2005; Rodríguez-Zaragoza, 1994). Dentro de las amebas existen otros grupos morfológicos, dividiéndose en amebas seudotestadas, testadas y desnudas. Los tres diferentes grupos de amebas son un componente muy importante dentro de los sistemas edáficos.

La biodiversidad ha sido considerada como un índice que refleja la estabilidad de los suelos perturbados y no perturbados (Coûteaux, 1976; Wodarz et al. 1992), sin embargo el grado de estabilidad sólo puede ser conjeturado. En general la diversidad de protozoos promueve la descomposición de la materia orgánica (Stout, 1980). Por ejemplo las amebas testadas, en contraste con otros invertebrados, aumentan su diversidad y abundancia cuando aumenta la concentración de humus. Además, la tasa de descomposición aumenta y está correlacionada con el número de generaciones de las especies de mayor tamaño (Schönborn, 1992 a y b). Las evidencias generadas en los

experimentos de laboratorio muestran un claro aumento de la mineralización de los nutrimentos como el N y P. En ambos casos el ramoneo que llevan a cabo las amebas aumenta la mineralización de estos dos elementos (Griffiths, 1994; Zwart, *et al.* 1994; Bonkowski, 2004). Muchos protozoos asimilan aminoácidos y algunos autores sugieren que pueden excretar amonio (Darbyshire, 1994). La presión de la depredación que los protozoos ejercen hacia las bacterias es muy grande, particularmente las amebas son las responsables entre el 50-70% del flujo del nitrógeno en esta parte del circuito microbiano (Zwart y Brussaard, 1991; Zwart, *et al.* 1994). Esta interacción entre la microflora y la microfauna sirve de conexión del flujo de materia y energía hacia los niveles más altos de las redes tróficas. Al alimentarse de la biomasa bacteriana la digestión de éstas por sus depredadores moviliza y remineraliza nutrientes que las bacterias habían obtenido de las rocas o del suelo (como el P) y el N u otros elementos traza que no están biodisponibles. Por tal razón se les considera entidades clave en los ciclos biogeoquímicos (Coûteaux y Darbyshire, 1998; Zwart, *et al.* 1994) y en la mineralización de algunos contaminantes (Holubar *et al.*, 2000; Mattison *et al.*, 2005). Ya que en el proceso de biorremediación las bacterias degradan o transforman a los hidrocarburos utilizando estas moléculas para la generación de su biomasa. En estudios de microcosmos se ha observado que los cultivos mixtos bacterianos son más eficientes en este proceso. Otro factor que aumenta la biorremediación es la bioestimulación, donde se aumenta la actividad de la comunidad bacteriana con ayuda de materia orgánica o nitrógeno disponible incrementando la mineralización de contaminantes (Sarkar *et al.*, 2005). Dentro de los diferentes factores que aumentan la biorremediación el estudio de la interacción depredador presa es importante por su estrecha relación con el aumento del metabolismo de los

contaminantes del suelo (Holubar *et al.*, 2000; Mattison *et al.*, 2005). Existen varias hipótesis que explican la influencia positiva sobre la mineralización de C por bacterias y se resumen en efectos directos como resultado del ramoneo ya que liberan diferentes sustancias en su forma biodisponible provocando como efecto indirecto el crecimiento de otras especies microbianas. La mineralización del carbono sólo es posible en presencia de N y P (Ratsak *et al.*, 1996). Por ello la presencia de depredadores es esencial ya que éstos excretan el N en forma de amonio (Sherr y Sherr, 1982) al igual que otros elementos como C y P (Hunt *et al.*, 1977). El ramoneo de los protozoos incrementa la tasa metabólica de sus presas bacterianas bajo ciertas condiciones ya sean aeróbicas o anaeróbicas (Holubar *et al.* 2000; Biagini *et al.* 1998; Fenchel, 1987). Holubar y colaboradores (2000) reportaron que el ramoneo de ciliados incrementa la demanda química de oxígeno (O) y la eficiencia en la degradación en sedimentos con petroquímicos. Rogerson y Berger (1983) observaron que el ramoneo de ciliado *Colpidium colpoda* aumentó la degradación de petróleo crudo en un cultivo mixto de bacterias. Mattison *et al.* (2005) detectaron un aumento de hasta tres veces en la velocidad de degradación de benceno en presencia del flagelado *Heteromita globosa*.

Para entender la función que los protozoos de vida libre tienen en el ecosistema, Pratt y Cairns (1985), Cairns J. Jr y Henebry (1982) concentraron a diferentes especies de agua dulce por sus preferencias alimenticias en seis diferentes grupos tróficos; fotosintéticos, autótrofos, bacterívoros/detrívoros, saprotrofos, alguívoros, omnívoros y depredadores, que también podemos hallar en el suelo. El uso de este tipo de grupos relaciona la estructura de la comunidad con la función que cada especie puede estar

llevando a cabo en el ecosistema. Ya que una de las ventajas es la reducción de la información que cada especie proporciona con respecto al sistema, simplificando la estructura de la comunidad, eliminando la confusión que es resultado de la identificación de los taxa con funciones redundantes (Bahr, 1982 y Hawkins y Sedell, 1981).

Por lo tanto los cambios en la estructura de la comunidad están relacionados con la eficiencia en las funciones y servicios que realiza el ecosistema. La función del ecosistema puede mantenerse aún ante grandes cambios estructurales, gracias a la redundancia de funciones que las especies llevan a cabo en las comunidades. Por lo tanto aunque observemos cambios en la estructura los efectos sobre los procesos de flujo de energía y reciclado de nutrientes o su movimiento entre los diferentes compartimentos del sistema no se ven alterados de manera sustancial (Pickett *et al.*, 1989).

Cuando se contaminó el suelo de cultivo con combustóleo, se alteraron principalmente las condiciones físicas y biológicas de éste. En condiciones menos extremas las amebas desnudas son los protozoarios más abundantes en el suelo, además de que juegan un papel muy importante en la conexión entre las redes tróficas de la microfauna y la fauna del suelo, por ello la pregunta que se realizó fue: ¿Cómo cambiará la comunidad de amebas desnudas en el suelo de cultivo contaminado por combustóleo? Debido a esta serie de factores nosotros esperábamos encontrar una disminución de la riqueza de especies de amebas desnudas en el suelo de cultivo contaminado con combustóleo, ya que se alteraron diferentes propiedades edáficas en el suelo de cultivo hace aproximadamente seis años.

### ***Objetivo general***

Evaluar el efecto del combustóleo sobre la riqueza de especies de la comunidad de amebas desnudas en una parcela del Municipio de Jalacingo, Veracruz.

### ***Objetivos particulares***

- Evaluar la riqueza de especies de la comunidad de amebas desnudas en el suelo no contaminado y en el suelo contaminado.
- Evaluar la cantidad de individuos en las dos áreas de la parcela.
- Determinar la similitud entre las especies de las dos áreas en la parcela.
- Realizar un modelo de redes tróficas en el suelo contaminado y no contaminado.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

### **Ubicación del área de estudio**

El ejido Orilla del Monte forma parte del Municipio Jalacingo, Veracruz, ubicado en la zona centro del estado, en las coordenadas 19°48' de latitud norte y 97°18' de longitud oeste, a una altura de 1944 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con los municipios de Tlapacoyan; al este con Atzalan y Altotonga; al sur con Perote; al oeste con el estado de Puebla. Su distancia aproximada al noroeste de la capital del estado por carretera es de 65 Km. Tiene una superficie de 287.95 K<sup>2</sup>, cifra que representa 0.39 por ciento del total del estado. El municipio se encuentra ubicado en la zona central y montañosa del estado, siendo su topografía accidentada (Fig. 1).

### **Vegetación**

Los bosques, tanto de coníferas como mesófilo de montaña y algunos encinares, se localizan en dos porciones del estado: una se encuentra en los límites con Hidalgo, en la subprovincia del Carso Huasteco; y la otra, mayor, en la parte central del estado, dentro de la provincia del Eje Neovolcánico.

La precipitación media anual es de 2000 mm, el suelo permanece húmedo durante ocho meses. La temperatura media anual es de 14 °C.

Actualmente la zona de estudio es una parcela que se utilizó para el cultivo de leguminosas, ubicada a un costado de la carretera pavimentada de los Húmeros de Perote en el Municipio de Jalacingo que forma parte del estado

de Veracruz. El mayor porcentaje de esta superficie se utiliza en agricultura y ganadería (<http://www.emexico.gob.mx/work/EMM04/Veracruz/index.html>). La zona contaminada esta situada en el Ejido Orilla del Monte, en la parcela fríjol colorado propiedad del Sr. Antonio Pérez Rivas, con las coordenadas 19° 35' 16" N y 97° 21' 06" O; una altitud de 2410 msnm en la carretera pavimentada de los Húmeros a Perote, que colinda al Norte 99 m con la carretera pavimentada de los Húmeros, al Sureste 229.06 m con parcela 871, al Suroeste 97 m con el ejido Fríjol colorado, al noroeste 230 m con parcela 858.

La parcela contaminada tiene un área total de 50 m<sup>2</sup>, la cual sufrió una exposición a hidrocarburos y posteriormente a otra de combustóleo. En la zona contaminada se recolectaron 6 muestras al azar de 0 a 20 cm. de profundidad y se mezclaron homogéneamente formando una muestra compuesta. El muestreo fue realizado por Carlos López Ortiz (Ingeniero Ambiental).

La parcela se dividió en dos secciones debido a un derrame a combustóleo hace aproximadamente nueve años. Debido a esto, a cada sección se le dio la caracterización de contaminada y no contaminada respectivamente. La categorización de contaminada se otorgó por cuantificación de hidrocarburos totales en la muestra compuesta fue de 50 000 ppm en el suelo contaminado rebasando los límites permisibles. Esta determinación se realizó en el Colegio de Posgraduados.

## **Toma de muestras**

### **Muestra compuesta**

En cada sección se tomaron seis muestras aleatorias en una caminata en forma de zigzag de 0-15 cm de profundidad, se tamizaron en una cernidora de 2 mm de apertura, posteriormente las muestras de cada sección se mezclaron homogéneamente formando una muestra compuesta para cada zona y se depositaron en bolsas de polietileno autosellables, en las que se transportaron al laboratorio, donde se almacenaron a 4 °C (Margesin, 2005).

Se efectuaron dos muestreos; el primero durante el mes de Octubre del 2005 y el segundo en Octubre del 2006.

### **Estimación de número de amebas desnudas**

La mezcla homogénea se hizo con el fin de tener una representación general de la parcela. Para la estimación de la cantidad de amebas se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP) en placas de cultivo celular de 24 pozos. Se lavaron y esterilizaron en horno de microondas en total 10 pulsos de calentamiento de 30 s, dando un total de 5 min.

Se preparó una dilución 1:10, con 1 g de suelo resuspendido en 10 ml de extracto de suelo. Éste se homogenizó con ayuda de un vortex mediante 5 pulsos de 15 s para cada muestra. La mezcla se dejó reposar durante 45 min

con el objeto de permitir la sedimentación de las arcillas y partículas de gran tamaño.

A cada pozo se le agregaron 500  $\mu\text{l}$  de agar no nutritivo (para que las amebas tuvieran una superficie donde reptar), 900  $\mu\text{l}$  de extracto de suelo y finalmente 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de suelo resuspendido para realizar la dilución 1:10 por pozo. En cada placa se obtuvieron seis diluciones decimales de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  con cuatro repeticiones por dilución.

Las placas de cultivo celular se incubaron durante 15 días a 28 °C y se revisaron en el microscopio invertido registrando la presencia-ausencia de amebas desnudas. Se realizaron 20 repeticiones (10 de cada muestra). Los datos se analizaron con una *t* de student en Excel.

## **Detección de especies**

Para la determinación de especies se requirió la preparación de extracto del suelo no contaminado de la parcela. Se homogeneizaron 200 g de suelo en 1 L de agua destilada en baño María a 60 °C durante dos horas. Se filtró con papel Watman42, es importante que el extracto de suelo esté aún caliente ya que se filtra más rápidamente. El extracto filtrado, se esterilizó a 121 °C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Para identificar las especies de amebas desnudas se utilizaron cultivos en cajas petri con agar no nutritivo, 13 g de agar en 1 L de extracto de suelo

diluido (1:5). El proceso fue el siguiente: se homogeneizó 1 g de suelo en 10 ml de extracto estéril de suelo y se dejaron reposar por 45 min con el fin de que se precipitaran las partículas. Posteriormente el sobrenadante se vertió en la caja petri sobre las placas de agar, dejando reposar con una leve inclinación durante 2 h, después se retiró el exceso de líquido con una pipeta Pasteur estéril, las placas se incubaron a 28 °C por cinco días y se revisaron periódicamente para detectar amebas durante 30 días, debido a que la aparición de amebas sucede de manera sucesiva. Este método se realizó para las dos muestras (suelo contaminado y suelo no contaminado). La determinación morfológica se hizo con ayuda de un microscopio de contraste de fases con ayuda de claves especializadas (Page, 1976; Page, 1988; Page y Siemensma 1991 y de Patterson, 1996).

### **Determinación del volumen mínimo de muestra**

Para determinar el volumen mínimo de suelo en las que se halla representada la riqueza de especies, se le asignó una clave de registro a cada placa de cultivo utilizada para la determinación de especies registrándose la frecuencia (F) de aparición de amebas.

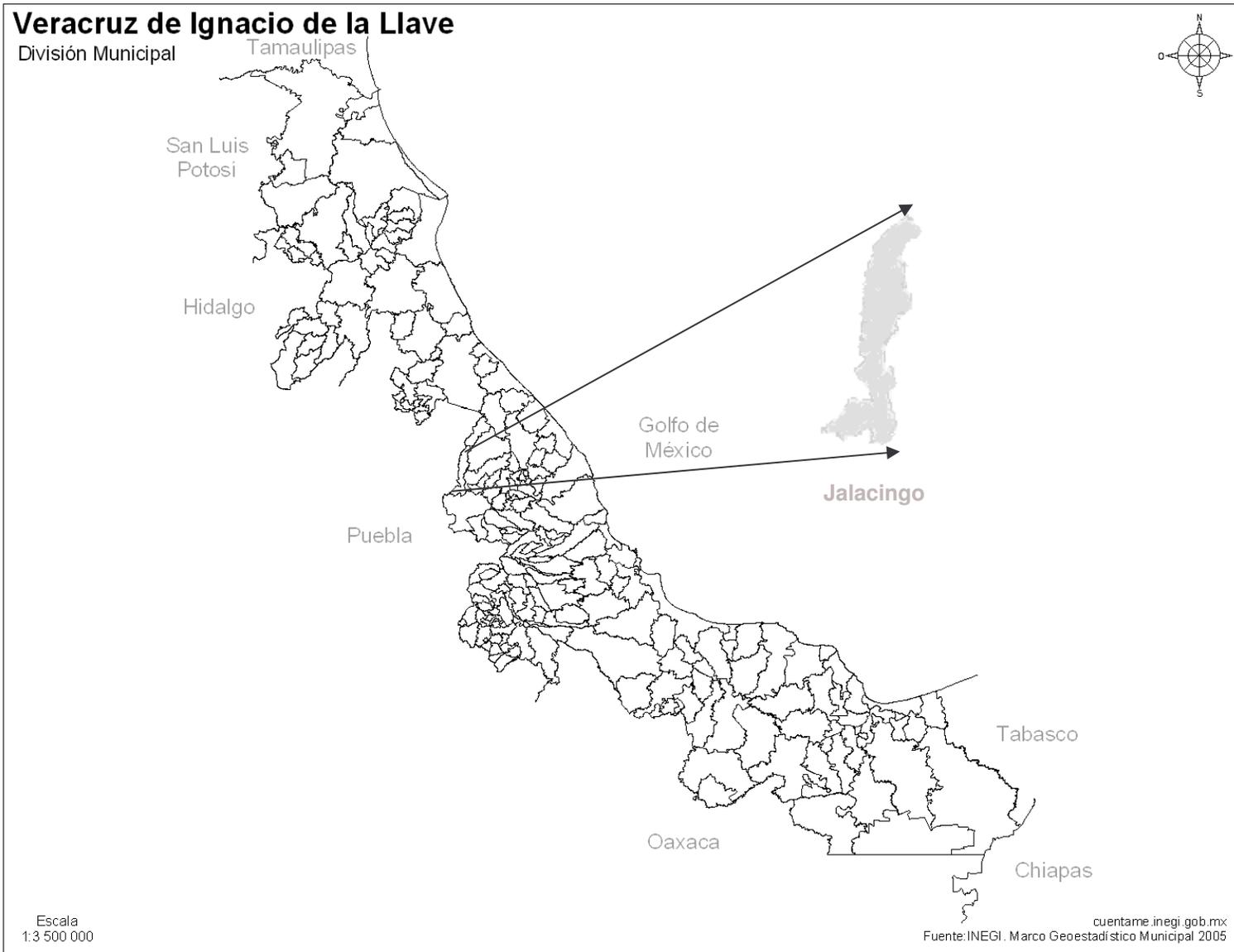
### **Análisis estadístico**

Para el conteo de amebas desnudas se utilizó una  $t$  de student en Excel. Para la estimación del volumen mínimo y la similitud de la riqueza de especies entre las diferentes comunidades se realizó un análisis de la similitud de

Sørensen con ayuda del programa PCORD® versión 4.3 para Windows®. Con este programa se calculó el volumen mínimo de la riqueza de especies.

### **Modelo de la red trófica**

El modelo de la figura ocho está basado en el modelo de la red trófica de Duffy y colaboradores (2007) y la integración en grupos tróficos establecido por Pratt y Cairns (1985). Lo que se hizo con la finalidad de simplificar la información generada a partir de la estructura de la comunidad y clasificar a los protozoos de vida libre en diferentes en grupos funcionales con base en sus hábitos alimentarios. Con este tipo de categorización podemos entender cual es el posible papel que estos grupos llevan a cabo dentro de los ecosistemas edáficos.



**Figura 1, Zona de estudio.**



Figura 2. Zona de estudio donde se pueden observar algunos pastos en el suelo contaminado, adyacentes a las zonas de cultivo.

## **RESULTADOS**

### **Año 2005**

En el primer muestreo, la abundancia de amebas desnudas en el suelo contaminado fue de  $2.1 \times 10^5 (\pm 0.15 \times 10^5)$  individuos por gramo de suelo y la zona no contaminada tuvo una abundancia de  $6.7 \times 10^4 (\pm 0.42 \times 10^4)$  individuos por gramo de suelo. Sin embargo, la abundancia de las amebas no fue significativamente diferente en las dos comunidades ( $p > 0.05$ ).

Se identificaron en total 52 especies pertenecientes a 24 géneros de 18 familias (tabla 1), de las cuales el 85 % pertenecen a la clase Lobosea y 15 % a la clase Heterolobosea. Las especies se determinaron de acuerdo con sus características morfológicas y en 16 casos sólo fue posible determinar a los organismos hasta nivel de género agregando sp<sub>n</sub>, debido a que algunas características no se ajustaron a las reportadas en las claves. Del total de las especies, exclusivamente 29 se localizaron en el suelo de cultivo de referencia (SR) y 7 spp en el suelo contaminado (SC) incluidas en los géneros; *Trichamoeba*, *Acanthamoeba*, *Filamoeba*, *Echinamoeba*, *Ghephyramoeba*, *Nuclearia* y *Mayorella*.

### **Suelo referencia (SR)**

Se encontraron en total 45 especies de amebas, las cuales se agruparon en 22 géneros pertenecientes a 16 familias. Las especies con mayor frecuencia

con tendencia a ser dominantes, se ubicaron dentro de la clase Heterolobosea y pertenecen al género *Vahlkampfia* (2 spp de F=8 y 1 sp F=2, Tabla 1), seguidas por las especies catalogadas como comunes las cuales pertenecen a los géneros; *Vanella* (1 sp), *Platyamoeba* (2 sp), *Flamella* (1 sp), *Dactylamoeba* (2 spp), *Mayorella* (2 spp), *Acanthamoeba* (2 spp), *Cochliopodium* (1 sp), *Paragocevia* (1 sp), *Filamoeba* (1 sp) y *Pessonella* (1 sp). Mientras que las especies más raras se ubicaron en la clase Lobosea (F = 1-2) dentro de los géneros, *Hartmannella* (1 sp), *Acanthamoeba* (4 spp) *Cochliopodium* (2 spp), *Hyalodiscus* (1 sp), *Rhizamoeba* (3 spp), *Nuclearia* (1 sp), *Vexillifera* (2 spp), *Dermamoeba* (2 sp), *Paraflabellula* (1 sp), *Mayorella* (1 sp), *Vannella* (2 spp), *Stachyamoeba* (1 sp), *Trichamoeba* (1 sp) y una especie de ameba testada del género *Trinema*; la clase heterolobosea con el género *Vahlkampfia* (4 spp), clase Vampyrella (1 sp), (ver tabla 1). La gama de frecuencias de las diferentes especies de amebas se ajustó a una distribución geométrica, ya que solo se registraron especies de frecuencia regular y rara (Fig. 3 a).

### **Grupos tróficos del suelo referencia**

Las especies se ubicaron en siete grupos tróficos (fig. 5 a): Bacterívoros (B, 21 spp) 51%, omnívoros (O, 6 spp) 15 %, alguívoros 10% (A, 4 spp) con preferencia hacia los hongos 7% (H, 3 spp) y levaduras con un 7% (L, 3 spp), protozoorívoros con 5 % (P, 2 spp) y con la preferencia alimenticia a protozoos y algas en un 5 % (P-A, 2 spp). Las preferencias alimenticias han sido reportadas por diferentes autores (Pratt y Cairns Jr. ,1985).

## Suelo contaminado (SC)

En la muestra del SC se observaron 24 especies de 14 géneros pertenecientes a 13 familias (Tabla 1). La especie dominante (F=10) forma parte de la clase Lobosea y pertenece al género *Trichamoeba* (1 sp) incluida en todos los submuestreos. Las especies comunes (F=3-8) se hallan en los géneros *Mayorella* (3 sp), *Acanthamoeba* (3 sp), *Filamoeba* (1 sp), *Paraflabellula* (1 sp), *Gephyramoeba* (1 sp) y *Stachyamoeba* (1 sp). Las especies raras presentaron una F = 2 o 1 y se repartieron entre los géneros *Echinamoeba* (1 sp), *Rhizamoeba* (1 sp), *Vexillifera* (1 sp), *Acanthamoeba* (1 sp), *Filamoeba* (1 sp), *Hyalodiscus* (1 sp), *Nuclearia* (1 sp), *Mayorella* (2 spp), *Platyamoeba* (1 sp). Cabe destacar que sólo una especie de la clase heterolobosea pertenecientes al género *Vahlkampfia* (2 spp, F=6) se encontró dentro de las especies comunes, mientras que en el caso de *V. ustiana* (F=1) se presentó como especie rara. Como lo muestra la figura 3 b, la frecuencia de las especies se ajustó a una distribución de tipo log-normal.

## Grupos tróficos en el suelo contaminado

Las especies se ubicaron en cuatro grupos tróficos (fig. 5 b): bacterívoros (13 spp) 69%, omnívoros (4 spp) 21 %, alguívoros (1 sp) 5% y los que se alimentan de hongos con 5% (1 sp).

## Similitud entre comunidades (año 2005)

El índice de similitud de Sørensen fue de 44 % entre las comunidades de ambos tratamientos.

Se presentó una notable disminución de la riqueza de especies en el suelo contaminado. Se observó una reducción de especies del género *Vahlkampfia* y la aparición de otras especies del género *Acanthamoeba*. Las especies de los géneros *Trichamoeba* y *Acanthamoeba*, presentaron una frecuencia rara en el suelo no contaminado. Sin embargo, en el suelo con combustóleo estos taxa dominaron apareciendo en todos los submuestreos. Las especies que pertenecen a los géneros *Stachyamoeba*, *Rhizamoeba*, *Hyalodiscus* y *Nuclearia* se mantuvieron en una frecuencia rara. Con respecto a los grupos tróficos la bacterivoría domina en las dos comunidades. Por otra parte en el suelo con hidrocarburos se registró una disminución en el número de especies del grupo omnívoro, alguívoro y la desaparición de 4 grupos tróficos con preferencia alimenticia hacia levaduras, protozoos y hongos.

## Año 2006

Se identificaron en total 49 especies pertenecientes a 20 géneros de 16 familias (tabla 1), de las cuales el 82 % pertenecen a la clase Lobosea y 18 % a la clase Heterolobosea. Las especies se determinaron de acuerdo con sus características morfológicas y en 12 casos sólo fue posible determinar a los organismos hasta nivel de género pero con características suficientes para clasificarlas como especie morfológica agregando sp<sub>n</sub>. Del total de especies que

estructuran la comunidad, exclusivamente 16 se localizaron en el SR y 16 spp exclusivas en el SC, donde las más frecuentes se hallaron dentro de los géneros *Mayorella* y *Dactylamoeba*.

## Suelo referencia

Se encontraron en total 33 especies de amebas en 16 géneros de 13 familias. Las especies con una frecuencia común ( $F = 3-8$ ) se reparten entre la clase Heterolobosea con el género *Vahlkampfia* (2 spp) y la clase Lobosea con los géneros *Mayorella* (2 sp), *Dactylamoeba* (2 sp) *Dermamoeba* (1 sp) y *Biomixa* (1 sp) Tabla 1. Las especies raras ( $F = 1-2$ ) se hallan en los géneros *Acanthamoeba* (2 spp), *Rhizamoeba* (1 sp), *Vannella* (3 spp), *Trichamoeba* (1 sp), *Deuteramoeba* (1 sp), *Cochliopodium* (2 spp), *Flamella* (1 sp), *Paraflabellula* (1 sp), *Nuclearia* (3 spp) *Mayorella* (4 spp) *Paradermamoeba* (1 sp), *Vahlkampfia* (4 spp) y 1 sp del género *Arcella* (Ameba testada). La gama de especies se ajustó a una distribución geométrica, ya que sólo se registraron géneros de frecuencia común y rara (Fig. 4 a).

## Grupos tróficos suelo referencia

Las especies se ubicaron en siete grupos tróficos (fig. 5 c): Bacterívoros (B, 12 spp) 45%, con la preferencia alimenticia a protozoos y algas en un 12 % (P-A, 3 spp), con preferencia hacia los hongos 11% (H, 3 spp), omnívoros (O, 2 spp) 8%, alguívoros 8% (A, 2 spp) y levaduras con un 8% (L, 2 spp) y protozoorívoros con 8% (P, 2 spp).

## Suelo contaminado

Se encontraron en total 33 especies de amebas en 15 géneros de 12 familias, de las cuales el 72% pertenecen a la clase Lobosea y el 24% a la clase Heterolobosea. Las especies comunes se ubicaron dentro de los géneros; *Mayorella* (3 spp), *Dactylamoeba* (2 spp), *Filamoeba* (2 spp), *Vahlkampfia* (3 spp), seguidas de *Paraflabellula* (1 sp), *Rhizamoeba* (1 sp), *Trichamoeba* (1 sp), *Acanthamoeba* (1 sp). (Figura 3). Las especies que pertenecen a los géneros *Hartmannella* (1 sp), *Acanthamoeba* (3 spp) *Ghephyramoeba* (1 sp), *Vahlkampfia* (5 spp), *Biomixa* (2 sp), *Echinamoeba* (2 spp), *Flamella* (2 spp), *Nuclearia* (1 sp), *Mayorella* (1 sp), ordenadas de mayor a menor frecuencia. Se observó un aumento en el número de especies del género *Acanthamoeba* y la aparición de otras especies del género *Mayorella*. La frecuencia de las especies se ajustó a una distribución de tipo geométrica (Fig. 4 b).

## Grupos tróficos del suelo contaminado

Las especies se ubicaron en seis grupos tróficos (fig. 5 d); Bacterívoros (B, 16 spp) 56%, omnívoros (O, 5 spp) 18%, con la preferencia alimenticia a protozoos y algas en un 12% (P-A, 3 spp), protozoorívoros con 10% (P, 3 spp), con preferencia hacia los hongos 3% (H-G, 1 sp) y alguívoros 1% (A, 3 spp).

## Similitud entre comunidades del segundo muestreo

El índice de similitud de Sørensen fue del 35% entre las comunidades de ambos tratamientos.

El número de especies fue el mismo en los dos tratamientos. Por otra parte *Vahlkampfia*, *Mayorella* y *Dactylamoeba* fueron los géneros en común. Particularmente las especies del género *Vahlkampfia* tuvieron frecuencias raras en el suelo contaminado. Las especies que pertenecen a los géneros *Stachyamoeba*, *Rhizamoeba*, *Hyalodiscus* y *Nuclearia* se mantuvieron en una frecuencia rara en los dos suelos. Se observó la aparición de otras especies de los géneros *Acanthamoeba* y *Vahlkampfia* en presencia del combustóleo. Con respecto a los grupos tróficos la bacterivoría domina en las dos comunidades.

## Variación interanual en la composición de las comunidades de los dos años

Las especies en común en los dos muestreos pertenecen a los géneros *Vahlkampfia* (3 spp), *Trichamoeba* sp, *Acanthamoeba* (2 spp), *Paraflabellula* sp, *Rhizamoeba* (1 sp) *Mayorella* (2 spp). Aunque estas especies se presentaron en todas las comunidades, el cambio se presentó en la distribución de algunas. La ameba *Trichamoeba* fue una sp rara en el suelo no contaminado del primer año, mientras que en el suelo contaminado fue la especie dominante. Otras spp beneficiadas pertenecían al género *Acanthamoeba* pasando de raras a comunes en el suelo contaminado. Mientras que no varió la distribución de las especies restantes.

Las especies bacterívoras y omnívoras dominaron en las comunidades de los dos años.

La investigación se centraba en la posibilidad de una disminución de la riqueza de especies en el suelo con combustóleo sin embargo, esta disminución de especies sólo se observó en el primer muestreo (Fig. 3 y tabla I), mientras que en el segundo muestreo la riqueza de especies aumentó en el suelo contaminado, equiparándose en número con el suelo sin combustóleo. La disminución se da en los grupos que estructuran la red trófica y la dominancia en los dos muestreos está representada por los gremios bacterívoro y omnívoro en todos los suelos.

### **Modelo de la red trófica**

Los esquemas muestran la estructura de la red trófica de ambos suelos con dos dimensiones que están dadas por relaciones horizontales (competencia interespecífica, coexistencia) y verticales (depredación). Dentro de la riqueza vertical se tienen tres niveles; el primer nivel consta de diferentes tipos de presas como bacterias, algas y hongos que están supuestos por las tendencias alimenticias del segundo nivel (fig. 6 y fig. 7). En el segundo nivel se observan diferentes gremios tróficos entre los cuales los más importantes son el bacterívoro y el omnívoro.

En el suelo no contaminado el segundo nivel trófico revela una cierta regularidad y dominio del grupo amibiano bacterívoro con la mayor proporción

de especies. Las especies omnívoras son el segundo grupo que domina en proporción a las demás. Dentro del mismo nivel y en menor porcentaje encontramos a los grupos tróficos de los alguívoros, honguívoros y los que se alimentan de levaduras. En el tercer nivel encontramos a los protozoorívoros con cuatro spp.

Tabla 1. Especies presentes en la parcela en cada sección en los dos muestreos realizados en octubre 2005 y octubre 2006 en el Municipio de Jalacingo, Veracruz (SR, suelo referencia; SC, suelo contaminado). Grupo trófico de la especie de ameba (B: bacterívoros, O: omnívoros, A: alguivoros, P: protozoarios, L: levaduras, H: hongos).

FAMILIA	Especie	Grupo trófico	2005		2006	
			Aparición SR	Aparición SC	Aparición SR	Aparición SC
VAHLKAMPFIIDAE	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	B	+	-	+	+
	<i>Vahlkampfia atopa</i>	B	-	-	-	+
	<i>Vahlkampfia avara</i>	B	+	-	+	+
	<i>Vahlkampfia debilis</i>	B	+	-	+	-
	<i>Vahlkampfia enterica</i>	B	+	+	+	+
	<i>Vahlkampfia hartmanni</i>	B	+	-	-	+
	<i>Vahlkampfia jugosa</i>	B	-	-	-	+
	<i>Vahlkampfia ovis</i>	B	+	+	+	+
	<i>Vahlkampfia ustiana</i>	B	+	+	+	+
GRUBERELLIDAE	<i>Stachyamoeba sp.</i>	B	+	+	-	-
AMOEBIDAE	<i>Trichamoeba sp</i>	*	+	+	+	+
	<i>Deuteramoeba algonquinensis</i>		-	-	+	-
HARTMANNELLIDAE	<i>Hartmannella vermiformis</i>	B	+	-	-	+
ACANTHAMOEBIDAE	<i>Acanthamoeba sp</i>	O	+	+	+	+
	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	O	+	-	-	-
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	O	-	-	-	+
	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	O	-	+	-	+
	<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	O	+	+	-	-

FAMILIA	Especie	Grupo trófico	2005		2006	
			Aparición SR	Aparición SC	Aparición SR	Aparición SC
COCHLIOPODIDAE	<i>Cochliopodium actinophorum</i>	L	+	-	+	-
	<i>Cochliopodium bilimbosum</i>	L	+	-	-	-
	<i>Cochliopodium minus</i>	L	+	-	-	-
	<i>Cochliopodium minutum</i>	L	-	-	+	-
	<i>Paragocevia sp</i>	A	+	-	-	-
ECHINAMOEBIIDAE	<i>Filamoeba nolandi</i>	B	+	+	-	+
	<i>Filamoeba sp</i>	-	-	+	-	+
	<i>Echinamoeba sp</i>	-	-	+	-	+
	<i>Echinamoeba exudans</i>	B	-	-	-	+
HYALODISCIDAE	<i>Flamella sp</i>	P	-	-	-	+
	<i>Flamella citrensis</i>	P	+	-	+	+
	<i>Hyalodiscus sp.</i>	-	+	+	-	-
FLABELLULIDAE	<i>Paraflabellula sp.</i>	-	+	+	+	+
GEPHYRAMOEBIIDAE	<i>Gephyramoeba sp</i>	-	-	+	-	+
LEPTOMYXIDAE	<i>Rhizamoeba australiensis</i>	P	+	-	-	-
	<i>Rhizamoeba sp1 transparente</i>	-	+	-	-	-
	<i>Rhizamoeba sp 2 raiz</i>	-	+	+	+	+
NUCLEARIIDAE	<i>Nuclearia sp simplex?</i>	H	+	-	+	-
	<i>Nuclearia sp 2</i>	H	-	+	-	-
	<i>Nuclearia moebiusi</i>	-	-	-	+	-
	<i>Nuclearia polypodia</i>	H-G	-	-	-	+
	<i>Nuclearia radians</i>	-	-	-	+	-

FAMILIA	Especie	Grupo trófico	2005		2006	
			Aparición SR	Aparición SC	Aparición SR	Aparición SC
PARAMOEBIDAE	<i>Dactylamoeba bulla</i>	P-A	+	-	+	+
	<i>Dactylamoeba stella</i>	P-A	+	-	+	+
	<i>Mayorella bicorniformis</i>	B	-	-	+	-
	<i>Mayorella cultura</i>	B	+	+	+	+
	<i>Mayorella microeruca</i>	P-a	-	-	+	+
	<i>Mayorella penardi</i>	B	+	+	+	-
	<i>Mayorella riparia</i>	B	-	+	-	-
	<i>Mayorella spatula</i>	B	+	+	+	+
VEXILLIFERIDAE	<i>Vexillifera sp</i>	-	+	-	-	-
	<i>Vexillifera anapes</i>	B	+	-	-	-
	<i>Vexillifera variabilis</i>	B	-	+	-	-
THECAMOEBIDAE	<i>Dermamoeba granifera</i>	H	+	-	+	-
	<i>Dermamoeba minor</i>	H	+	-	-	-
	<i>Paradermamoeba sp</i>	H	-	-	+	-
VANNELLIDAE	<i>Pessonella marginata</i>	B	+	-	-	-
	<i>Platyamoeba placida</i>	B	+	+	-	-
	<i>Platyamoeba stenopodia</i>	B	+	-	-	-
	<i>Vannella lata</i>	B	-	-	+	-
	<i>Vannella platypodia</i>	B	+	-	+	-
	<i>Vannella simplex</i>	B	+	-	-	-
VAMPYRELLIDAE	<i>Vampyrella sp</i>	-	+	-	-	-
BIOMIXIDAE	<i>Biomixa sp</i>	-	-	-	+	+
	<i>Biomixa vagans</i>	-	-	-	-	+
ARCELLIDAE	<i>Arcella sp</i>	-	-	-	+	-
TRINEMATIDAE	<i>Trinema sp</i>	-	+	-	-	-

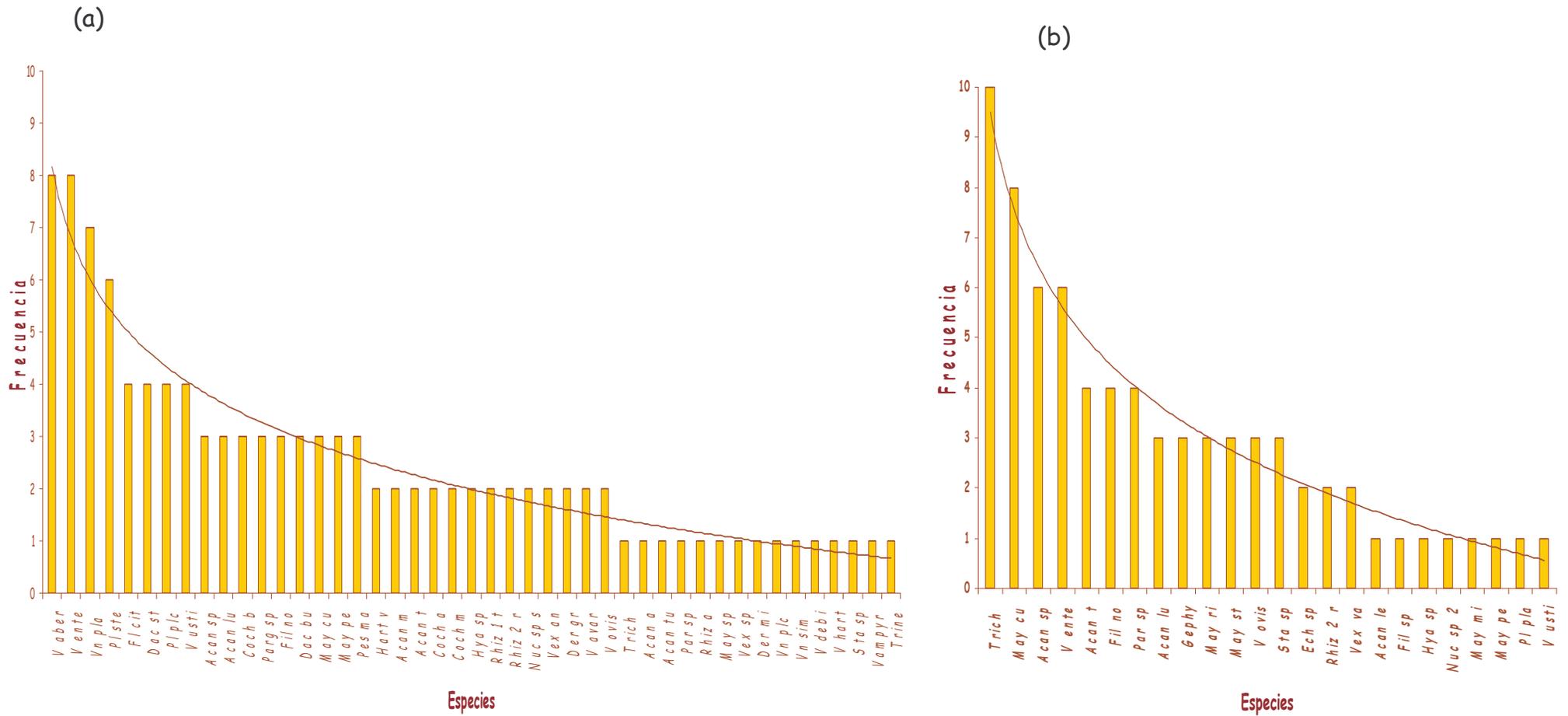


Figura 3. (a) Curva de frecuencia de especies de amebas desnudas en el suelo de cultivo sin contaminar que muestra una distribución geométrica y (b) curva de frecuencia de sp de amebas en el suelo contaminado que muestra una distribución "log-normal".

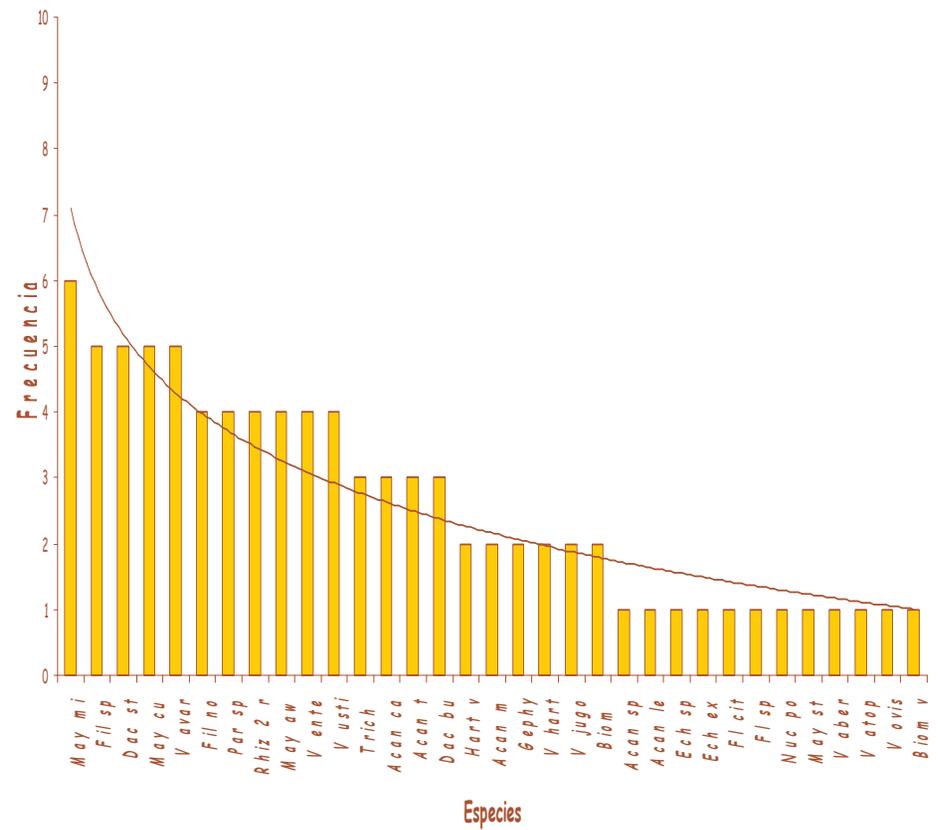
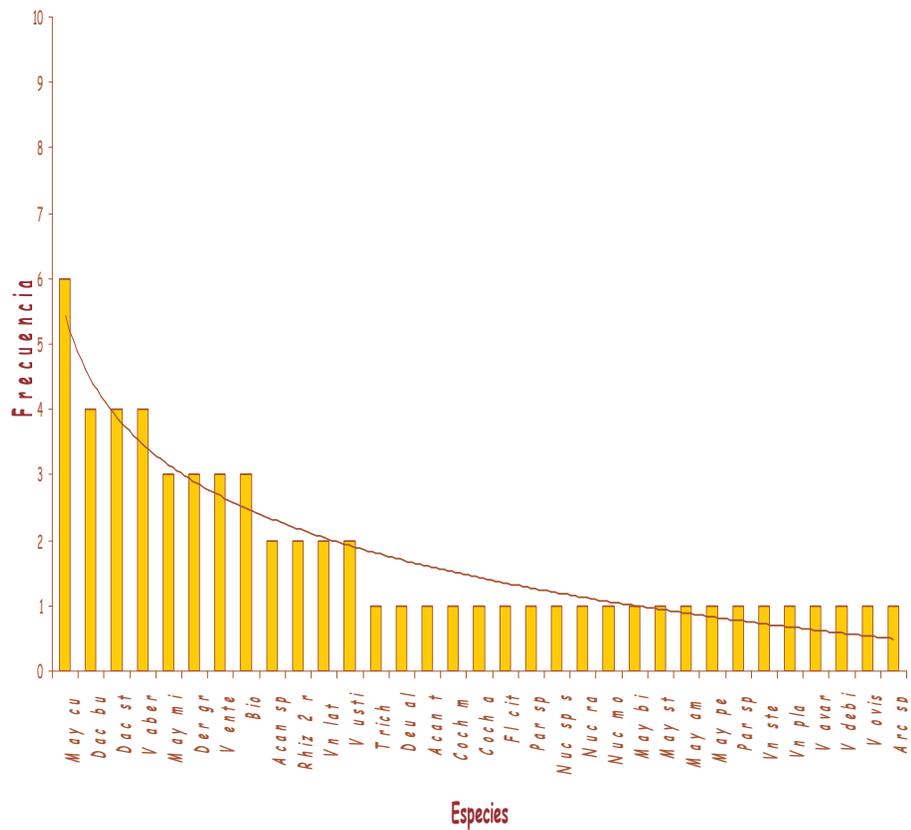


Figura 4. (a) Curva de frecuencia de especies de amebas desnudas en el suelo de cultivo sin contaminar y (b) curva de frecuencia de especies de amebas desnudas en el suelo de cultivo contaminado (segundo año).

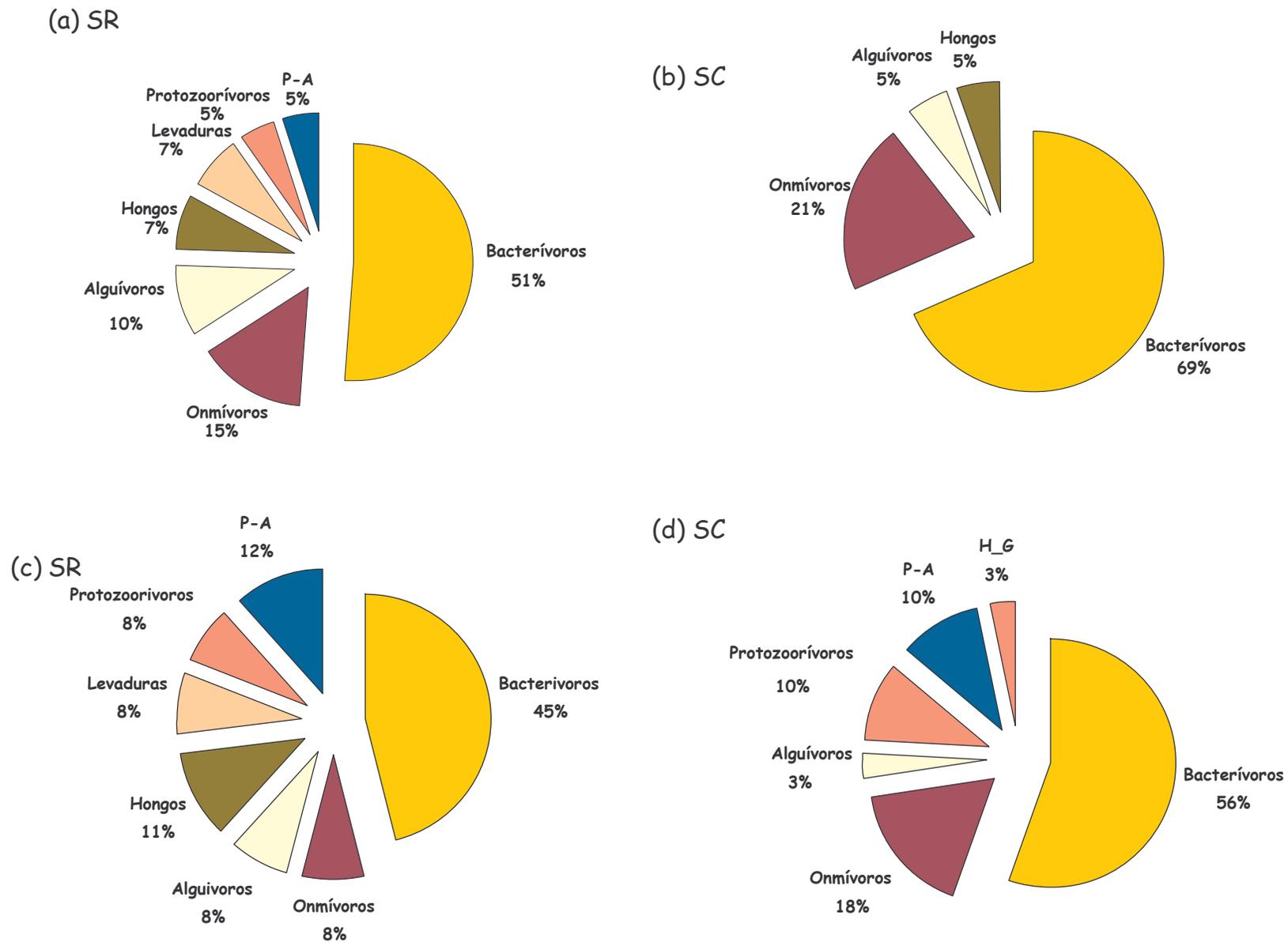


Fig. 5. Estructura trófica de la comunidad de amebas desnudas. (a), suelo referencia (SR) del año 2005; (b), suelo contaminado (SC) del año 2005; (c), suelo referencia del año 2006; (d), suelo contaminado del año 2006.

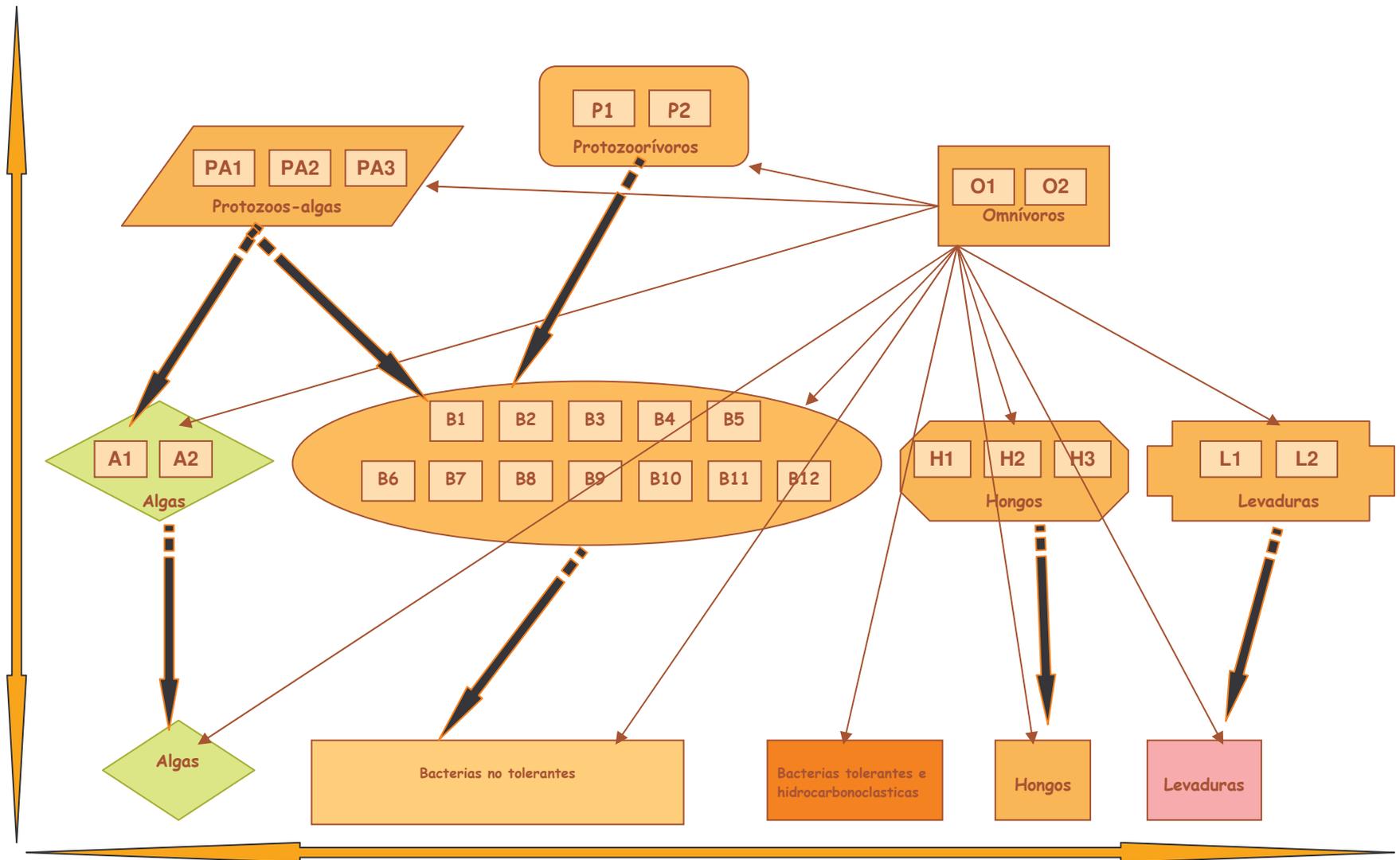


Figura 6. Red trófica esquematizada del suelo de cultivo contaminado con combustóleo del primer muestreo. Ilustra los componentes de la riqueza horizontal y vertical de las diferentes especies. La red consiste de diferentes especies. Los componentes de la riqueza vertical cuentan con la presencia de especies de amebas protozoorívoras, omnívoras, hongiívoras. También muestra la riqueza horizontal donde encontramos diferentes especies que comparten el nivel.

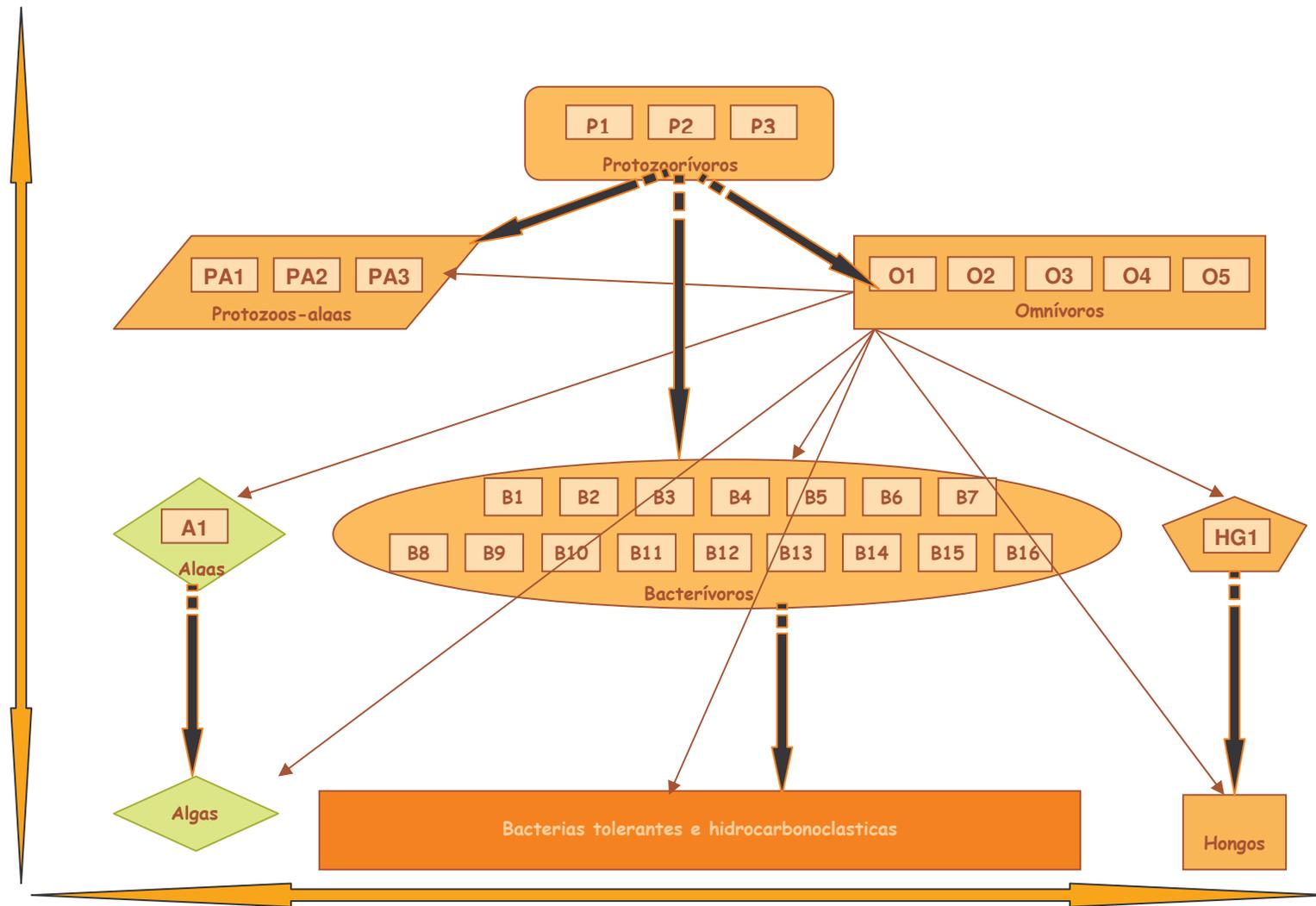


Figura 7. Red trófica esquematizada del suelo no contaminado con combustóleo del segundo muestreo. Ilustra los componentes de la riqueza horizontal y vertical de las diferentes especies. La red consiste de diferentes especies. Los componentes de la riqueza vertical cuentan con la presencia de especies de amebas protozoorívoras, omnívoras, hongoívoras. También muestra la riqueza horizontal donde encontramos diferentes especies que comparten el nivel.

## *DISCUSIÓN*

La biomasa microbiana del suelo sufre un decremento como efecto inmediato de la contaminación por la presencia de los hidrocarburos (Joynt *et al.* 2006). Por ello se esperaba que el número de organismos que conforman la comunidad de amebas desnudas fuera menor en el suelo con combustóleo. Sin embargo, la diferencia del número de individuos entre las comunidades del suelo contaminado y no contaminado no fue significativa. Lo anterior significa que los microorganismos del suelo se adaptaron rápidamente a los cambios (Brandon, 1990) y alteraciones que provocó el combustóleo en el sistema edáfico (Martínez y López, 2001), ya que el largo periodo de tiempo entre el evento de contaminación por combustóleo y el muestreo pudo influir positivamente en las poblaciones amebianas tolerantes a los hidrocarburos las cuales habrían ocupado el espacio de las spp desaparecidas.

Al analizar la similitud de la riqueza de especies entre las comunidades de los diferentes suelos se encontró poco parecido en las especies que las integran. Esta variación se pudo dar por diferentes razones. La primera de ellas es que solo se realizó solo una muestra compuesta **de 6 submuestras** en cada tipo de suelo con una replica después de un año no permitió realizar un análisis más adecuado de las especies, ya que no tiene alcance para encontrar un mayor número de spp raras. Sin embargo se tiene una visión general de las especies dominantes y de cómo estas especies se distribuyen de forma diferente en cada uno de los suelos. Como es el caso de *Trichamoeba* sp que a pesar de aparecer en los dos tipos de suelo se encontró con una frecuencia

rara en el suelo sin contaminar, mientras que en el suelo con combustóleo esta ameba fue dominante; el mismo caso ocurrió con varias especies de los géneros *Acanthamoeba* y *Mayorella*. Así, las diferentes especies del género *Vahlkampfia* pasaron de dominantes en el suelo no contaminado, a tener una frecuencia que fue de rara a común en el suelo contaminado. Aunque la comunidad de amebas exhibe un número mayor de especies en el suelo no contaminado, cabe destacar que la comunidad de amebas que habita el suelo contaminado parece ser más estable ya que las especies se distribuyen de una forma "Log-normal" como sucede en comunidades que se encuentran en ambientes sin perturbaciones antropogénicas.

No obstante, al analizar el segundo año se observó que la riqueza de especies fue la misma entre el suelo contaminado y no contaminado. La diferencia radica en la similitud de especies entre comunidades que solo fue del 36%. El suelo contaminado tiene 18 spp más con respecto al suelo no contaminado del año anterior. De la misma manera si se compara la similitud entre las comunidades de ambos suelos contaminados se observan variaciones dentro de los géneros y las especies, además de que en esta época se muestra una distribución geométrica. Lo que sugiere que la repartición de los recursos es más equitativa y las especies dominantes están disminuidas.

Otra de las razones por las que se pudieron haber dado los cambios entre las comunidades es que no se dio seguimiento de las mismas a través del tiempo, por lo tanto no está fuera de alcance asegurar que las diferencias observadas son causa directa del contaminante, sino que pueden ser

consecuencia de la dinámica de las mismas comunidades causadas por su entorno y las condiciones del lugar donde se realizó el estudio.

Sin embargo, no se puede excluir por completo el tipo de distribuciones encontradas en el SNC y el SC ya que hay una clara dominancia de ciertas spp. El SNC y el SC presentan diferentes distribuciones las cuales pueden deberse a diferentes factores que provoquen disturbios en su hábitat. Para ello es necesario analizar cada una de las distribuciones encontradas en cada suelo. En el suelo de cultivo se obtuvo una distribución de frecuencias de especies de tipo geométrica (McGill *et al.*, 2007). Este tipo de distribución generalmente se da en sistemas que sufren perturbaciones intermedias (Connell, 1978 y Sousa, 1979). En el suelo de cultivo la revoltura de los horizontes induce modificaciones estructurales provocando una perturbación de este tipo (Roxburgh *et al.*, 2004; Shea *et al.*, 2004; Chesson, 2000 y Darbyshire, 1994). Esta perturbación es constante y se correlaciona con el cambio y la pérdida de la diversidad dentro del edafón en suelos utilizados para la agricultura (Rapport y Whitford, 1999 y Buckley y Schmidt 2001). Dentro de estos sistemas desequilibrados los efectos suelen ser positivos para muchas de las diferentes especies que conforman la comunidad edáfica. Estos efectos se hacen evidentes por el impacto directo hacia las especies dominantes. Ya que al observar la distribución de spp en el suelo no contaminado, estas sólo se presentaron con frecuencias comunes y raras (McGill *et al.*, 2007). La disipación de las especies dominantes se debe al cambio abrupto de las condiciones óptimas en donde éstas se desarrollaban. Así, unas especies sustituyen a otras debido a diferentes procesos; ya sea por su capacidad de soportar la perturbación constante de su ambiente, una tasa de crecimiento

poblacional mayor, una eficiencia superior para evadir a sus depredadores y la facultad de sobrevivir a condiciones adversas y con poca diversidad de alimento. Este es el caso de muchas especies del género *Acanthamoeba*, clasificadas dentro de los estrategas oportunistas por su facilidad de invadir los nichos desocupados por otras especies (Coûteaux y Darbyshire, 1998). Esta serie de factores explican la ausencia de amebas dominantes en la comunidad del suelo de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, otra consecuencia de la perturbación en suelos es la pérdida de la riqueza de especies. Esta disminución de especies está correlacionada con el tipo de fuente de energía, el nivel de perturbación que existe en el sistema y las sensibilidades de las especies ante estos cambios (Scholes *et al.*, 2005).

En el caso del suelo contaminado la alteración se consideró de alto nivel de intensidad ya que la concentración de hidrocarburos en el suelo fue 50 000 ppm, rebasando los límites permisibles de este tipo de mezclas en el ambiente. La frecuencia de las especies de amebas en el suelo contaminado se ajusta a una distribución log-normal, descrita como una curva conformada por numerosas especies raras, algunas comunes y en menor número las dominantes (McGill *et al.*, 2007). Esta distribución normalmente se da en comunidades pertenecientes a ecosistemas estables (Preston, 1981; McGill *et al.*, 2007). La prolongada exposición a los hidrocarburos, la ausencia de las perturbaciones ocasionadas por la utilización del suelo para el cultivo, además de la rápida adaptación de los microorganismos a los cambios en su ambiente aunado la existencia de flora en el área contaminada pudo haber resultado en que el

sistema adquiriera una nueva forma de equilibrio. El establecimiento de diferentes especies de plantas tolerantes al combustóleo permite pensar en la posibilidad de una asociación rizosférica en donde la planta puede tener la función de soporte de las comunidades de protozoos ya que sus diferentes fases de desarrollo ofrecen microambientes menos extremos no sólo bajo su ramaje, sino también en la zona interrizosférica (Rodríguez-Zaragoza *et al.* 2005). Así, sobre el suelo la planta proporciona sombra atemperando la radiación, lo que facilita la sobrevivencia de diferentes especies microbianas, mientras tanto, en el subsuelo la raíz provee de diferentes exudados a los microorganismos que habitan en la rizósfera y que pueden funcionar como recurso para los protozoos (Lynch *et al.*, 2002; Zwart, *et al.* 1994).

Asimismo la diferencia entre las comunidades de amebas puede deberse a otros factores como; el tipo de vegetación de cada suelo y a la presencia del combustóleo. Los hidrocarburos producen efectos importantes sobre las propiedades de textura, materia orgánica, densidad real y porosidad del suelo. Así la presencia del combustóleo pudo provocar diferencias entre la microbiota de las comunidades pertenecientes a ambos suelos. Ya que el combustóleo tiene efectos significativos sobre el contenido de materia orgánica ya que está aumenta en forma proporcional a la concentración de hidrocarburos del combustóleo (Martínez y López, 2001). Sin embargo, el combustóleo está conformado por productos con estructuras de  $C_{25}$  a  $C_{35}$  correspondientes a compuestos saturados, poliaromáticos y de cadena larga (Philip *et al.*, 1984); por lo tanto, son compuestos difíciles de oxidar, por ello se le puede considerar como materia orgánica recalcitrante y disponible sólo para pocas especies de organismos hidrocarbonoclasticos (Pineda-Flores *et al.* 2004). No obstante, el

verdadero impacto se encuentra en la porosidad del suelo, ya que este parámetro disminuye drásticamente a partir de concentraciones de 20 000 mg Kg<sup>-1</sup>. La porosidad se disminuye por la ocupación del hidrocarburo entre los espacios porosos (Martínez y López, 2001). Este factor físico puede explicar la distribución de algunas amebas en este ambiente extremo. La textura y el tamaño de los poros son determinantes en la distribución a microescala de los protozoos del suelo (Yeates *et al.* 1991); como es el caso de las amebas testadas y seudotestadas halladas en el suelo no contaminado, que gracias a la testa y a su tamaño no tienen la posibilidad de ocupar poros más pequeños. En el caso de las amebas desnudas esto no parece ser problema, debido a su capacidad de formar subseudópodos como es el caso de los géneros *Biomixa* y *Mayorella*, encontradas en ambos tipos de suelo, donde la primera tiene la capacidad de formar protusiones citoplasmáticas largas, flexibles y de un grosor de hasta cinco micras haciendo accesible cualquier presa que habite en poros de esta medida (Patterson, 1996; Page y Siemensma, 1991). En poros de mayor volumen podemos encontrar a géneros de mayor tamaño como la *Trichamoeba*, así como amebas de menor tamaño como podría ser el caso de los géneros *Mayorella* o *Vahlkampfia*, que tienen la posibilidad de habitar y acceder a poros de cualquier tamaño.

Los hidrocarburos son moléculas hidrófobas y al adsorberse sobre los agregados del suelo provocan la disminución de agua, además su coloración oscura puede aumentar la temperatura del suelo haciendo aún menos disponible la humedad. Las amebas han desarrollado diferentes adaptaciones a condiciones extremas de temperatura y a ambientes con poca disponibilidad de agua como es el caso de *Acanthamoeba* y *Hartmanella* (Bamforth *et al.* 2005), o

como en biomas desérticos donde hallamos al género *Acanthamoeba*, *Filamoeba* y *Vahlkampfia*. Donde la influencia de la espesura de la raíz puede generar un microambiente con la suficiente humedad para permitir la sobrevivencia de más especies de microorganismos (Rodríguez-Zaragoza et al. 2005). Poco se sabe acerca de la tolerancia de estos organismos ante agentes tóxicos, aunque se tienen algunos reportes de amebas tolerantes a fungicidas y a bromuro de metilo en suelos agrícolas (Ekelund, 1999 y Rodríguez-Zaragoza et al. 2003). Sin embargo, la contaminación por hidrocarburos probablemente afecta la diversidad de amebas por la toxicidad de esta mezcla así como a las presas de su preferencia (Ekelund, 1999). Se ha registrado que las amebas del género *Acanthamoeba* con una relación filogenética muy cerrada con *A. castellani*, *Filamoeba nolandi* y *Ghephyramoeba* prosperan en ambientes contaminados con hidrocarburos (Lara et al. 2007). Por su parte las especies del género *Vahlkampfia* suelen ser poco abundantes en ambientes degradados (González, 2005).

Estos resultados se enfocan al entendimiento del proceso potencial en el suelo perturbado con combustóleo. Estudios recientes sugieren que los cambios en las propiedades inherentes de una comunidad como la pérdida de la diversidad pueden alterar el funcionamiento y los servicios que puede brindar el ecosistema (Hopper et al., 2005). El periodo entre los muestreos no permite saber si es una variación natural de la comunidad o si hay un efecto del combustóleo sobre la diversidad de amebas ya que la similitud entre las comunidades de ambos años es muy diferente. Por ello se requirió de la integración de las especies en grupos tróficos del suelo referencia y el contaminado. El modelo muestra algunos patrones en estos sistemas. Dentro de

este modelo el grupo funcional de los bacterívoros dominó en el suelo contaminado, pero además se hallaron otros grupos como los que se alimentan de algas, protozoarios, levaduras, hongos y sus combinaciones. Estos otros grupos forman parte de las redes tróficas del suelo y son contempladas en el modelo de la red trófica. Aunque poco abundantes en número de spp, estos grupos son los que parecen sufrir cambios ante las perturbaciones del ambiente. El efecto sobre la dinámica poblacional de las spp de amebas depredadoras que conforman todos estos grupos está fuertemente correlacionada con la presencia o ausencia de su alimento (Gilbert, 2003).

En el suelo contaminado del primer año observamos que la red trófica sufre una disminución de grupos tróficos importantes dentro del nivel dos y tres; como es el caso de fungívoros, protozoorívoros y algunas spp del grupo alguívoro, sin embargo en el segundo año estos grupos aumentan en el número de especies.

Para la construcción del modelo de la red trófica del suelo contaminado, la riqueza de especies fue integrada dentro de niveles tróficos (riqueza horizontal) y a través de estos niveles (riqueza vertical y omnivoría; Pickup y Parry, 2007). Al analizar los grupos funcionales horizontales; se reconoce una clara dominancia de diferentes spp con tendencias bacterívoras, lo que indica que las bacterias sirven como sostén de las poblaciones en este ambiente perturbado. En el segundo año las especies bacterívoras aumentan, posiblemente por un aumento de las poblaciones bacterianas. Así este suelo con combustóleo concentra el recurso vivo del primer nivel de la red. El aumento de especies en la comunidad de bacterias explicaría el aumento en la riqueza de

amebas bacterívoras y omnívoras en el segundo año. Ya que se ha observado que las amebas bacterívoras y omnívoras tienden a preferir ciertas especies bacterianas (Pickup y Parry, 2007; Rønn *et al.*, 2002).

El gremio omnívoro se presentó en todos los suelos con la diferencia en la riqueza de spp ya que el número aumentó en el suelo contaminado. La supervivencia de este grupo a condiciones tan estresantes sugiere la capacidad de incrementar la amplitud de su nicho en ambas dimensiones. Este grupo estuvo conformado por amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba* y son clasificadas como estrategias "r". Ya que esta ameba ha desarrollado adaptaciones para sobrevivir bajo condiciones ambientales muy adversas, gracias a su alta tasa reproductiva (Bamforth *et al.* 2005). Esto genera la posibilidad de que el sistema en el suelo contaminado exista una transferencia de materia en forma biodisponible. No se sabe que tan eficiente sea esta transferencia de materiales pero estas especies indican que los nutrientes en forma biodisponible no se retienen mucho tiempo. Al desaparecer ciertos grupos pertenecientes al gremio de los protozoorívoros la presión ejercida a las otras especies de amebas que servían de presa podrían reducir y permite el desarrollo de ciertos grupos como es el caso de los omnívoros. De la misma forma otros depredadores podrían desocupar espacio del nicho, como algívoros o fungívoros reduciendo la presión hacia las amebas del género *Acanthamoeba*. Este género se reconoce por que la mayoría de sus especies no tienen requerimientos específicos y tiene la capacidad de aprovecharse de muy pocos recursos. Sin embargo, cuando el nicho fue afectado y las condiciones del suelo no contaminado se transformaron por el combustóleo, las especies que dominaban en el ambiente no contaminado desaparecen al no tener las

condiciones idóneas, mientras que otras spp se ven favorecidas, como es el caso de las especies que se encuentran dentro del género *Acanthamoeba*.

El efecto del combustóleo sobre las comunidades de protozoos indica que los grupos tróficos como los alguívoros son sensibles a la contaminación con hidrocarburos.

La proporción de especies que están dentro de un grupo funcional son muy similares entre los sistemas. Dentro del sistema no contaminado la riqueza de especies es mayor y la distribución de estas dentro de las categorías alimenticias refleja diferencias en su número con respecto al suelo contaminado. Sin embargo este sistema presentó un cambio contundente en el número de spp de cada gremio alimenticio. Lo que sugiere que cada grupo alimenticio puede estar regulado por la diversidad de recursos.

Los resultados obtenidos con el modelo de la red trófica del suelo contaminado sugieren que los protozoarios bacterívoros pueden ser los responsables de la mayoría del recambio, reciclaje y flujo de nutrientes a través de la red trófica que se desarrolló en el SC de los dos años.

## *CONCLUSIÓN*

Las poblaciones de amebas encontradas en el suelo contaminado sugieren que hay efectos positivos del combustóleo sobre estas especies. Más allá de decir que las amebas son capaces de metabolizar de forma directa estos compuestos, es más probable que estas poblaciones reaccionen ante el incremento de su alimento que está en forma de bacterias hidrocarbonoclásticas, dando una posible ventaja a las amebas del grupo bacterívoro. Lo anterior puede ser una indicación de que las amebas desnudas están jugando una función dentro de los procesos de biorremediación.

## ***PERSPECTIVAS***

Este trabajo es una línea base a partir de la cual surgen diversas preguntas y recomendaciones para estudios posteriores. Una recomendación importante es realizar varias muestras compuestas para permitir un análisis más refinado con respecto a la riqueza de especies. Además se necesita hacer un seguimiento de la comunidad de amebas con respecto al tiempo y observar si existe una correlación entre la riqueza de especies y la concentración de combustóleo. Pero para definir si existe un efecto directo del combustóleo sobre la comunidad de estos microorganismos se requeriría hacer un estudio de microcosmos bajo condiciones controladas, para así posteriormente relacionar la velocidad de degradación del combustóleo con la presencia o ausencia de diferentes especies de amebas. A la par es necesario estandarizar nuevas técnicas de observación dentro del campo de la microscopía epifluorescente con el objetivo de observar de forma directa a las especies de amebas que realmente están en su forma activa (de trofozoito) en el suelo de este estudio. Esto sería el comienzo para determinar el posible papel que estos organismos llevan a cabo dentro del complicado proceso de la biorremediación, además de comprobar si son elementos activos dentro de la degradación o mineralización de este tipo de compuestos.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

- Aislabie, J., Fraser, R., Duncan, S., Farrell, R. L. 2001. Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*. 24: 308-13.
- Aislabie, J., Fough, J, Saul, D. 2000. Aromatic-hydrocarbon degrading bacteria isolated from near Scott Base, Antarctica. *Polar Biology*. 23:183-8.
- Anderson, O.R., Gorrel, T., Kruzanzky, R., Levandowsky, M. 2001. Naked amoebas and bacteria in an oil-impacted salt marsh community. *Microbiology Ecology* 42: 474-481.
- Bahr, L. M. 1982. Functional taxonomy: an immodest proposal. *Ecology Modelling*. 15:211-233.
- Bamforth, S. S., Wal, H. D., Virginia, R. A. 2005. Distribution and diversity of soil protozoa in the McMurdo dry valleys of Antarctica. *Polar Biology*. 28, 756-762.
- Biagini, G. A., Finlay, B. J., Lloyd, D. 1998. Protozoan stimulation of anaerobic microbial activity: enhancement of the rate of terminal decomposition of organic matter. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 1-8.
- Bonkowski, M. 2004. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist*. 162, 3: 617-631.
- Bouwer, E. J., Zehnder, A. J. B. 1993. Bioremediation of organic compounds- putting microbial metabolism to work. *Trends in biotechnology*. 2:360-367.
- Brandon, R. N. 1990. *Adaptation and environment*. Ed. Princeton University Press. USA. 214 pp.
- Buckley, D. H., Schmidt, T. M. 2001. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbiology Ecology*. 42:11-21.

- Cairns, J. Jr. y Henebry, M. S. 1982. Interactive and noninteractive protozoan colonization processes, en Cairns J. Jr., ed., *Artificial Substrates*. Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan. 23-70.
- Chesson, P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 31, 343-366.
- Clarholm, M., 2005. Soil protozoa: an under-researched microbial group gaining momentum. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 811-817.
- Coleman, D., Fu, S., Hendrix, P., Crossley, Jr. D. 2002. Soil foodwebs in agroecosystems: impacts of herbivory and tillage management. *European Journal of Soil Biology*. 38,21-28.
- Connell, J. H. 1978. Diversity in tropical rain forest and coral reefs. *Science*. 199, 1302-1310.
- Coûteaux, M. M., Darbyshire, J. F. 1998. Functional diversity amongst soil protozoa. *Applied Soil Ecology* 10: 229-337.
- Coûteaux, M. M. 1976. en Coûteaux M. M., Darbyshire J. F. 1998. Functional diversity amongst soil protozoa. *Applied Soil Ecology* 10: 229-337.
- Darbyshire, J. F. 1994. Soil protozoa. CAB INTERNATIONAL. London 209 PP.
- De Hoog, G. S., Zeng, J. S., Harrak M. J., Sutton, D. A. 2006. *Exophiala xenobiotica* sp. an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:257-268.
- Duffy, E., Cardinale, B.J., France, K.E., McIntyre, P. B., Thébault, E. y Loreau, M. 2007. The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecology letters*. 10, 522-538.
- Ekelund, F. 1999. The impact fungicide fenpropimorph (Corbel ®) on bacterivorous and fungivorous protozoa soil. *Journal of Applied Ecology*. 36, 233-243.

<http://enlace.vazquezchagoya.com/?m=200711>

<http://www.epa.gov/>

<http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2007/08/29/fuga-de-combustoleo-en-termoelectrica-contamina-playas-de-tuxpan-veracruz>

<http://www.hidrosur.com.mx/files/combustoleo-pesado.pdf>

Fenchel, T. 1987. Ecology of Protozoa. Springer-Verlag, Berlin

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

Gilbert, D., Mitchell, E. A. D., Amblard, C., Bourdier, G., André-Jean F. 2003. Population Dynamics and Food Preferences of the Testate Amoeba *Nebela tincta major-bohemica-collaris* Complex (Protozoa) in a *Sphagnum* Peatland. *Acta Protozoologica*. 42: 99 - 104.

González-Lozano, E. 2005. Correlación de la riqueza de especies de amebas desnudas con los factores fisicoquímicos del suelo en una terraza degradada de La Cuenca Baja del Río Salado, Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México. TESIS. 49 p.

Griffiths, B. S. 1994. Soil nutrient flow. En: Darbyshire, J. F. (Ed.), Soil Protozoa. CAB International, Wallingford, pp. 65-91.

Hawkins, C. P. y Sendell, J. R. 1981. Longitudinal and seasonal changes in functional organization of macroinvertebrate communities in four Oregon streams. *Ecology*. 62: 387-397.

- Holubar, M. P., Grudke, T., Moser, A., Strenn, B., Braunm, R. 2000. Effects of bacterivorous ciliated protozoans on degradation efficiency of a petrochemical activated sludge process. *Water research*. 34, 7: 2051-2060.
- Hooper, D. U., Chapin, F.S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J. H., Lodge, D. M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Seta, H., Symstad, A. J., Vandermeer, J., Wardle, D. A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*. 75, 3-35.
- Hughes, K. A., Bridge, P. y Clark, M. S. 2007. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment*. 372: 539-548.
- Hunt, H. W., Cole, C. V., Klein, D. A., Coleman, D. C. 1977. A simulation model for the effect of predation on bacteria in continuous culture. *Microbial Ecology* 3: 259-278.
- Joynt, J., Bischoff, M., Turco, R., Konopka, A., Nakatsu, C. H. 2006. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. *Microbial Ecology* 5; 12:209-219.
- Konopka, A. 2000. Theoretical analysis of the starvation response under substrate pulses. *Microbial Ecology* 38:321-329.
- Lara, E., Berney, C., Ekelund, F., Harms, H., Chatzinotas, A. 2007. Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology y Biochemistry*. 39, 139-148.
- Lynch, J. M., Brimecombe, M. J. y De Leij, F. 2002. Rhizosphere. *Encyclopedia of life sciences & Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group*. 1-8.
- Margesin, R., Schinner, F. y Zaos, T. 2005. *Manual of soil analysis monitoring and assessing soil bioremediation*. Springer. 366 p.

- Martínez, V. E., López, S. F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra* 19, 9-17.
- Mattison, R.G., Taki, H., Harayama, S. 2005. The soil flagellate *Heteromita globosa* accelerates bacterial degradation of alkylbenzenes through grazing and acetate excretion in batch culture. Springer Science+Business Media, Inc. Vol: 49, 142-150.
- McGill, B. J., Etienne, R. S., Gray, J. S., Alonso, D., Anderson, M. J., Benecha, H. K., Dornelas, M., Enquist, B. J., Green, J. L., He F., Hurlbert, A. H., Magurran, A. E., Marquet, P. A., Maurer, B. A., Ostling, A., Soykan, C. U., Ugland, K. I., and White, E. P. 2007. Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. *Ecology Letters*. 10:995-1015.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J. 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science & Technology*. 26, 1278-1284.
- Nadon, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Krewski, D., Guerin, M. 1995. Cancer risk due to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *American Journal of Industrial Medicine*. 28, 303-324.
- Nicolellaa, C., Zolezzib, M., Rabinob, M., Furfarob, M., Rovattic, M. 2005. Development of particle-based biofilms for degradation of xenobiotic organic compounds. *Water Research*. 39, 2495-2504.
- Odum, E. P. 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *BioScience* 35, 7: 419-422.
- Odum, E. P., Finn, J. T., Franz, E. H. 1979. Perturbation theory and the subsidy-stress gradient. *BioScience* 29, 6: 349-352.

- Ollivier, B., Magot, M. 2005. *Petroleum Microbiology*. ASM PRESS Washington, D. C. 365 pp.
- Page, F. C. 1976. *An illustrated key to freshwater and soil amoebae*. Freshwater biological Association, Ambleside, Cumbria, U.K. 155 p.
- Page, F. C. 1988. *A new key to freshwater and soil gymnamoebae*. Freshwater biological Association, Ambleside, Cumbria, U.K. 122 p.
- Page, F. C., Siemensma, F. J. 1991. *Nackte rhizopoda and Heliozoa*. Gustab-Fisher Verlag, Stuttgart. 297 p.
- Patterson, D. J. 1996. *Free-living freshwater protozoa*. Ed. John Wiley & Sons. Inglaterra. 223 pp.
- Philip, C. V., Bullin, J. A., Anthony, R. G. 1984. GPC Characterization for assessing compatibility problems with heavy fuel oils. *Fuel Processing Technology*. 189-201.
- Pickett, S. T. A., Kolasa, J., Armesto, J. J., Collins, S. L. 1989. The ecological concept of disturbance and its expression at various hierarchical levels. *Oikos*. 54: 129-136.
- Pickup, Z. L., Parry, J. D. 2007. Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. *Applied and environmental microbiology*. 73: 8, 2631-2634.
- Pineda-Flores, G., Boll-Argüello, G., Lira-Galeana, C., Mesta-Howard, A. M. 2004. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltene as a carbon and energy source. *Biodegradation* 15: 145-151.
- Pratt, R. J., Cairns, J. Jr. 1985. Functional groups in the protozoa: roles in differing ecosystems. *Journal Protozoology*. 32:3 415-423.

- Preston, F. W. 1981. Pseudo-Lognormal Distribution. *Ecology* 62:2, 355-364.
- Rapport, D. J., Whitford, W. G. 1999. How ecosystems respond to stress. *BioScience*. 49, 3 193-203.
- Ratsak, C. H., Maarsen, K. A., Kooijman, S. A. L. M. 1996. Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. *Water Research* 30: 1-12.
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*. 20; 3:225-241.
- Rodríguez-Zaragoza, S., Dorante, I., Velasco-Velasco, J., Ferrera-Cerrato, R. 2003. Impacto de la fumigación con bromuro de metilo en tipos morfológicos de amebas desnudas de un suelo agrícola. *Terra Latinoamericana*. 197-205.
- Rodríguez-Zaragoza, S., Mayzlish, E., Steinberger, Y. 2005. Vertical distribution of the free-living amoeba population in soil under Desert Shrubs in the Negev Desert, Israel. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:4, 2053-2060.
- Rogerson, A., Berger, J. 1983. Enhancement of the microbial degradation of crude petroleum by the ciliate *Colpidium colpoda*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 29: 41-50.
- 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: 6094-6105.
- Roxburgh, S. H., Wilson, J. B. 2004. The intermediate disturbance hypothesis: patch dynamics and mechanisms of species coexistence. *Ecology*. 85, 359-371.
- Sánchez-Moreno, S., Ferris, H. 2007. Suppressive service of the soil food web: Effects of environmental management. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 119, 75-85.

- Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., Mendoza-López, M. R., Cruz-Sánchez, J. S., López-Ortiz, C., Delgadillo-Martínez J., Alarcón, A. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 22; 2: 63-73.
- Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., Birnbaum, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*. 136: 187-195.
- Shea, K., Roxburgh, S. H., Rauschert, E. S. J. 2004. Moving from pattern to process: coexistence mechanisms under intermediate disturbance regimes. *Ecology Letters*. 7, 491-508.
- Sherr, B. F., Sherr, E. B., Berman, T. 1982. Decomposition of organic detritus: a selective role for microflagellate protozoa. *Limnology and Oceanography*. 27: 765-769.
- Scholes, L., Warren, P. H., Beckerman, A. P. 2005. The combined effects of energy and disturbance on species richness in protist microcosms. *Ecology Letters*. 8:730-738.
- Schonborn, W. 1992 a. Comparative studies on the production biology of protozoa communities in freshwater and soil ecosystems. *Arch. Protistenk*. 141, 187-214.
- Schonborn, W. 1992 b. The role of protozoan communities in freshwater and soil ecosystems. *Acta Protozoologica*. 31, 11-18.
- Sousa, W. P. 1979. Disturbance in marine intertidal boulder fields: the non-equilibrium I maintenance of species diversity. *Ecology*. 60, 1225-1239.

- Stout, J. D. 1980. The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow. *Adv. Microbiology Ecology*. 4, 1-50.
- Trewavas, A. 2006. A brief history of systems biology. *The plant cell*, 18: 2420-2430.
- Wodarz, D., Aescht, E., Foissner, W. 1992. A weighed coenotic index (WCI): Description and application to soil animal assemblages. *Biology and Fertility Soils*. 14: 5-13.
- Yeates, G. W., Bamforth, S. S., Ross, D. J., Tate, K. R., Sparling, G. P. 1991. Recolonization of methyl bromide sterilized soils under four different field conditions. *Biology and Fertility Soils*. 11: 181-189.
- Zhang, C., Bennett, G. N. 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*. 67: 600-618.
- Zwart, K. B., Kuikman, P. J., van Veen, J. A. 1994. Rhizosphere protozoa: their significance in nutrient dynamics. In: Darbyshire JF, ed. *Soil protozoa*. Wallingford, UK: CAB International, 93-122.
- Zwart, K. B., Brussaard, L. 1991. Soil fauna and cereal crops. In: Firbank L. G., Carter N., Darbyshire J. F., Potts, G.R. (Eds.) *The Ecology of Temperate Cereal Fields*. Blackwell scientific publications, Oxford, pp. 139-168.

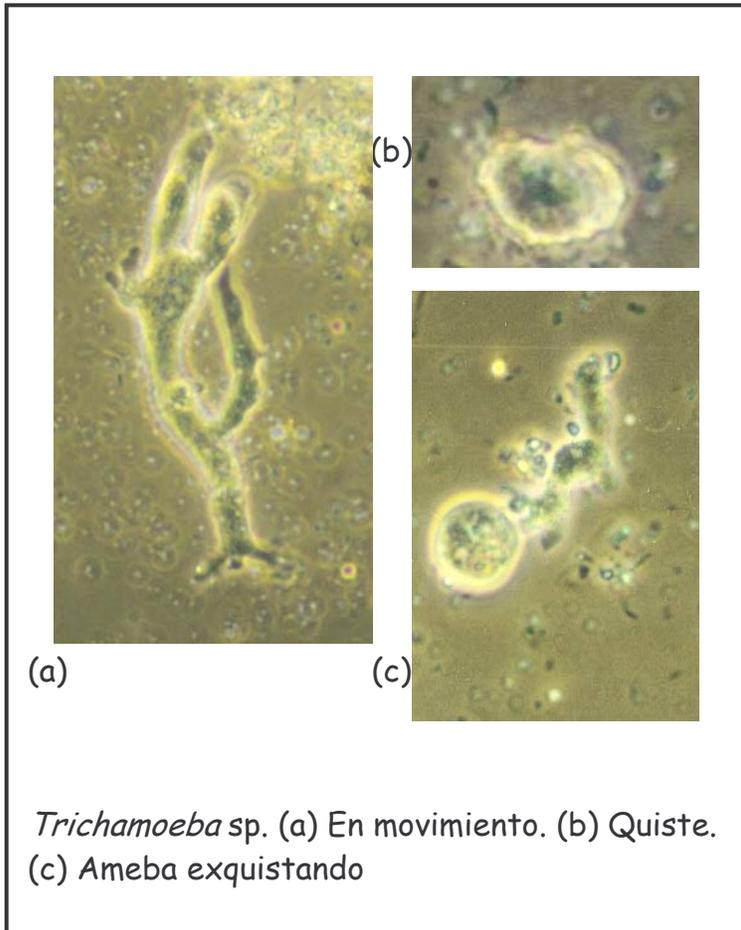
*ANEXO I*  
DESCRIPCIÓN E IMAGENES DE AMEBAS

## FAMILIA AMOEBIDAE

*Trichamoeba* sp.

Ameba semieruptiva, granulosa muchas veces ramificada con forma de coral, más o menos activa que forma pseudópodos redondeados. Su tamaño va de 100 a 500  $\mu\text{m}$  de largo y 15 a 20  $\mu\text{m}$  de ancho en movimiento. El desplazamiento se da por un pseudópodo de avance redondeado con una pequeña parte de limax en la parte anterior. El cambio de dirección es por medio de una proyección perpendicular del pseudópodo de avance. Algunas veces el pseudópodo de avance se proyecta totalmente a la dirección opuesta. El uroide se conforma de diferentes filamentos. La forma flotante es ramificada asemejando a un coral y con pseudópodos con punta redondeada.

El quiste tiene un tamaño de 30  $\mu\text{m}$  aproximadamente, con forma muy irregular. El quiste con una aparente pared externa muy irregular y el endoquiste con forma oval, con un ancho de 25  $\mu\text{m}$  y un largo de 45-50  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

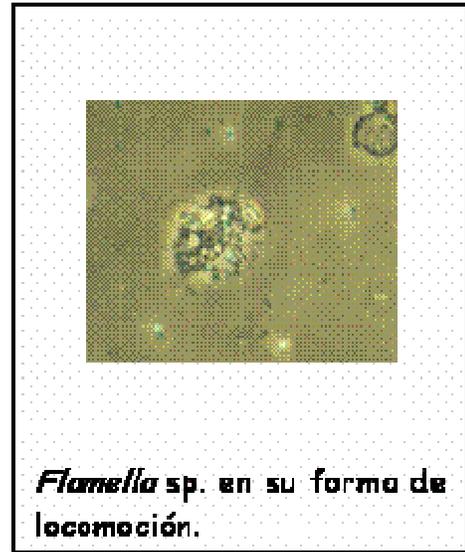


*Trichamoeba* sp. (a) En movimiento. (b) Quiste. (c) Ameba exquistando

## FAMILIA HYALODISCIDAE

*Flamella* sp.

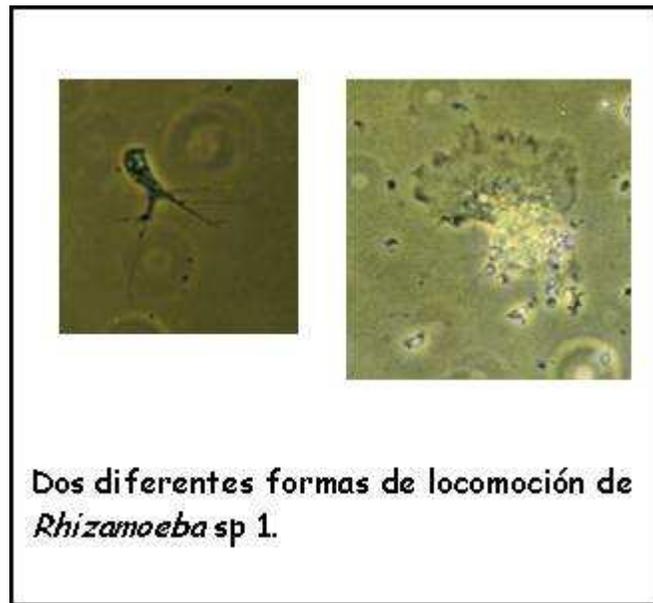
Forma de locomoción aplanada la mayoría de las veces en forma de triangulo irregular aplanada. Tamaño de 30  $\mu\text{m}$ . la célula en movimiento con un área hialina pronunciada en su lado anterior, donde se forman pseudópodos delgados redondeados en la punta. Algunas veces la forma del cuerpo muy variada sobre todo en movimiento rápido. El uroide muy adhesivo. Sin cristales citoplasmáticos. No se observo quiste.



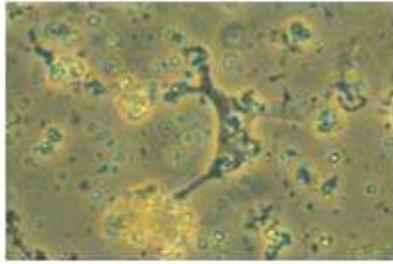
### FAMILIA LEPTOMYXIDAE

*Rhizamoeba* sp 1.

Forma de locomoción monopoidal, con un área hialina pronunciada. Con uroide aparentemente adhesivo con algunos filamentos. El tamaño de la célula con poco movimiento es de 40-50  $\mu\text{m}$  de largo y 60-70  $\mu\text{m}$  de ancho. La célula es muy irregular pero muchas veces tiene forma de abanico. El citoplasma se divide claramente en con pocos gránulos y carece de cristales, mientras que el hialoplasma ocupa una gran área celular que en movimiento lento la célula suele formar algunos pseudópodos piramidales o filamentosos. Quistes desconocidos.



*Rhizamoeba* sp 2.



Forma de locomoción de *Rhizamoeba* sp 2.

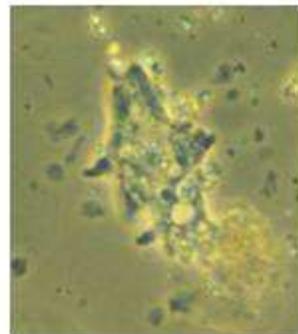
Forma de locomoción monopodial, con un área hialina poco pronunciada. Con uroide aparentemente adhesivo con muy pocos filamentos. El tamaño de la célula con poco movimiento es de 60-70  $\mu\text{m}$  de largo y 20-30  $\mu\text{m}$  de ancho. La célula es muy irregular pero muchas veces tiene forma de raíz. El citoplasma no tiene una

división del hialoplasma y granuloplasma y puede contener algunos cristales. La forma de los pseudópodos es delgada y va de filosa a redondeada en movimiento lento. Quistes desconocidos.

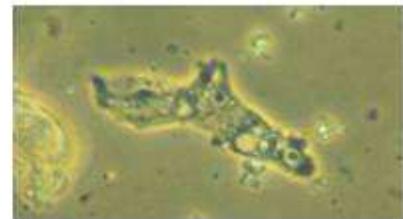
### FAMILIA FLABELLULIDAE

*Paraflabellula* sp.

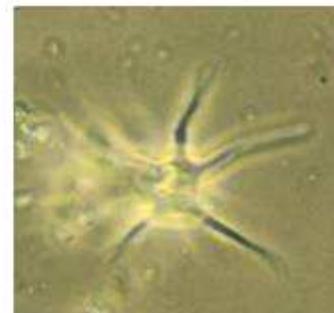
La forma de locomoción es usualmente entre 60-70  $\mu\text{m}$  con una forma triangular aplanada y elongada. Con algunas áreas de hialoplasma en donde se forman subseudópodos cortos. El granuloplasma con una gran cantidad de cristales. La célula suele dividirse en forma de V para cambiar de dirección. Forma flotante con pseudópodos radiados que terminan en una punta fina.



(a)



(b)



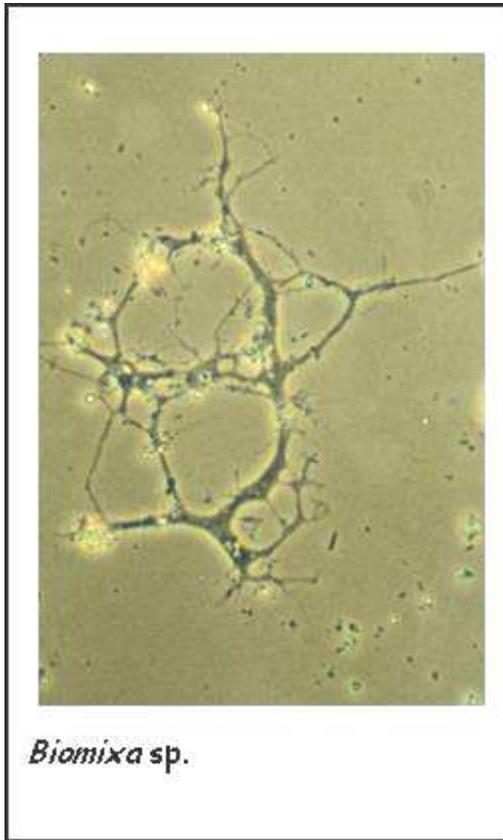
(c)

Forma de locomoción (a y b). Forma flotante (c).

### FAMILIA GRUBERELLIDAE

*Stachyamoeba* sp.

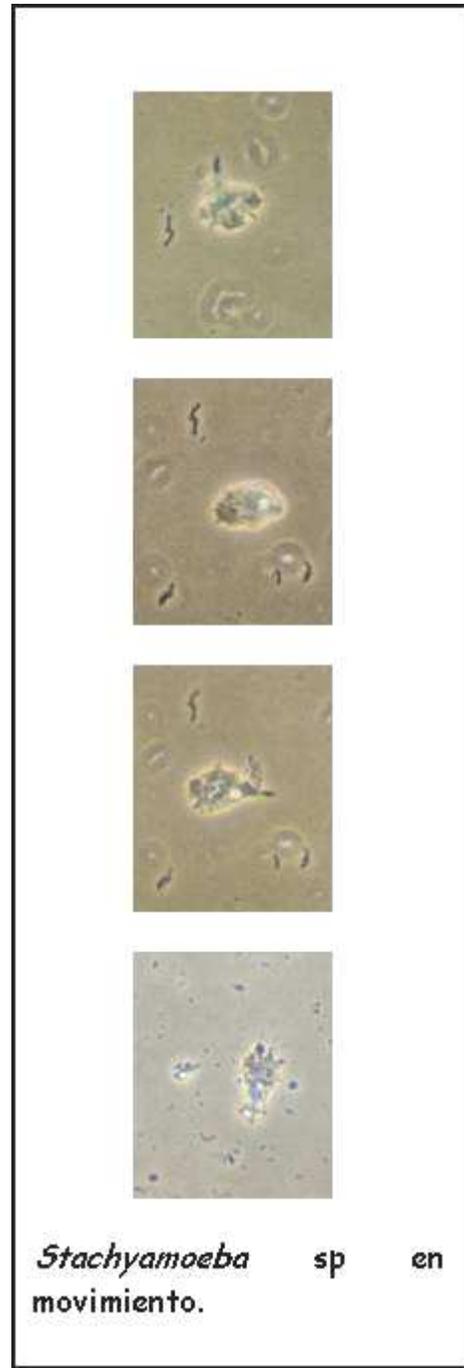
Forma de locomoción comúnmente aplanada, algunas veces en forma de abanico, ocasionalmente presenta limax. Seudópodo eruptivo, algunas veces presenta subseudópodos cortos pequeños y muy finos. Citoplasma con un solo núcleo.



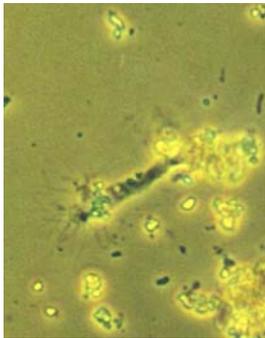
**FAMILIA BIOMYXIDAE**

*Biomyxa* sp.

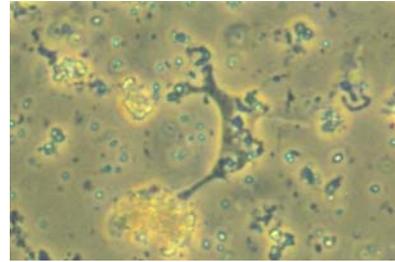
Morfología muy variable algunas veces extendida y reticulada y algunas veces delgada y estrecha. Seudópodos ramificados que se anastomosan. No hay distinción entre hialoplasma y granuloplasma. Contiene una gran cantidad de vacuolas.



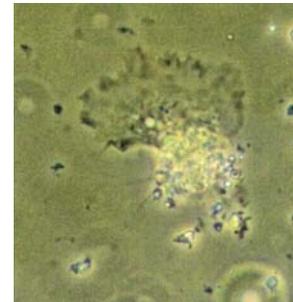
**FAMILIA LEPTOMYXIDAE**



*Rhizamoeba* sp. Suelo contaminado.



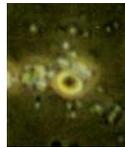
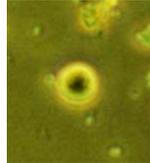
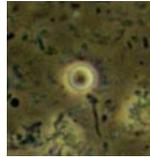
Forma de locomoción de *Rhizamoeba* sp 2. Suelo no contaminado.



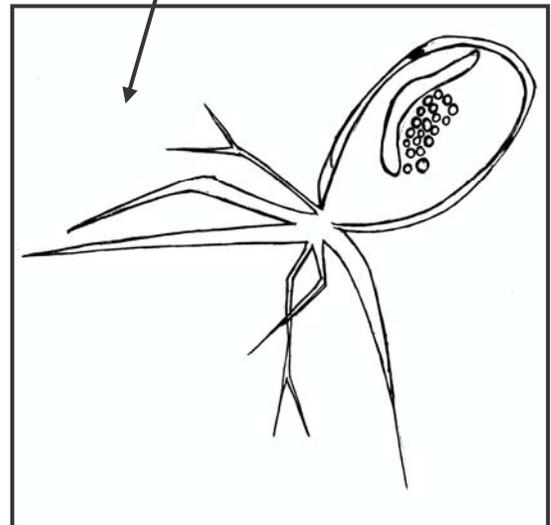
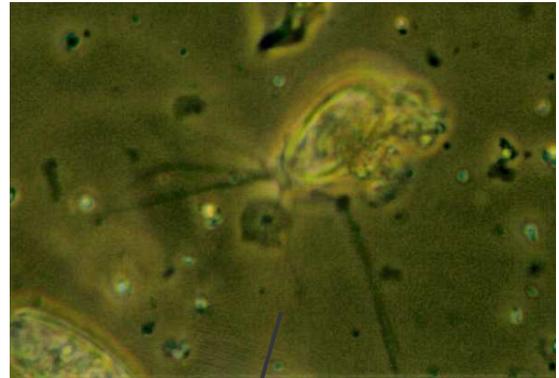
Dos diferentes formas de locomoción de *Rhizamoeba* sp 1. Suelo no contaminado.

FAMILIA VAHLKAMPFIIDAE

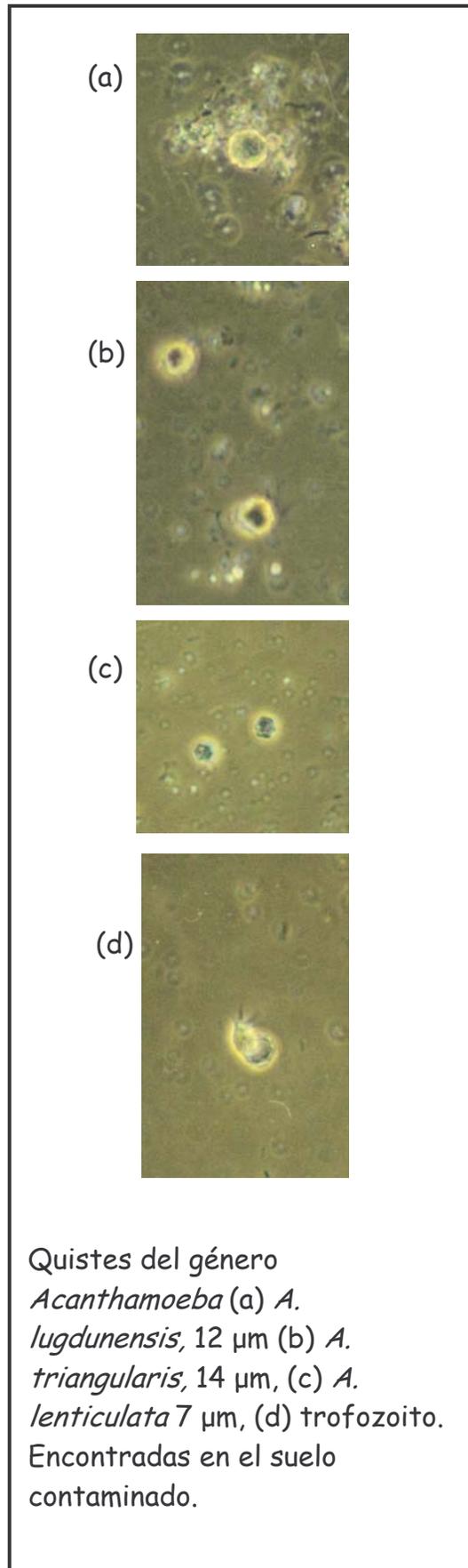
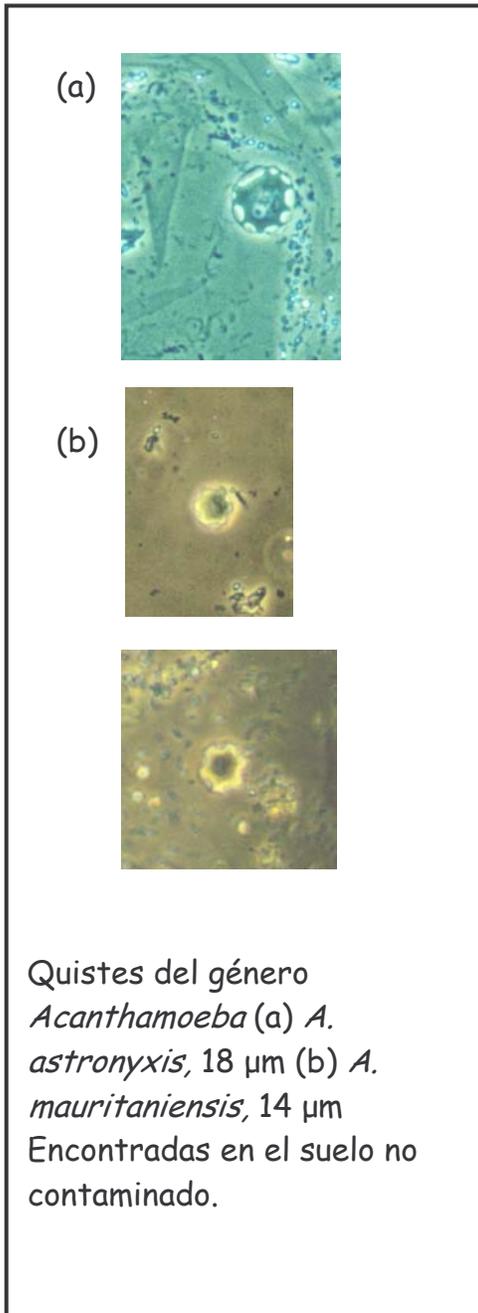
FAMILIA TRINEMATIDAE



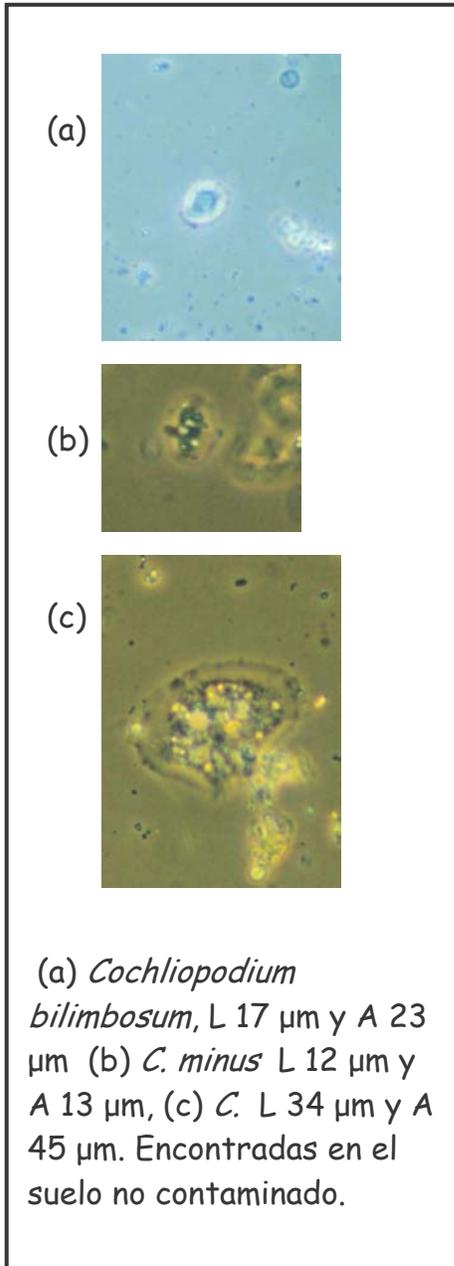
(a) *Vahlkampfia* sp., (b) *V. aberdonica*, (c) *V. ovis*



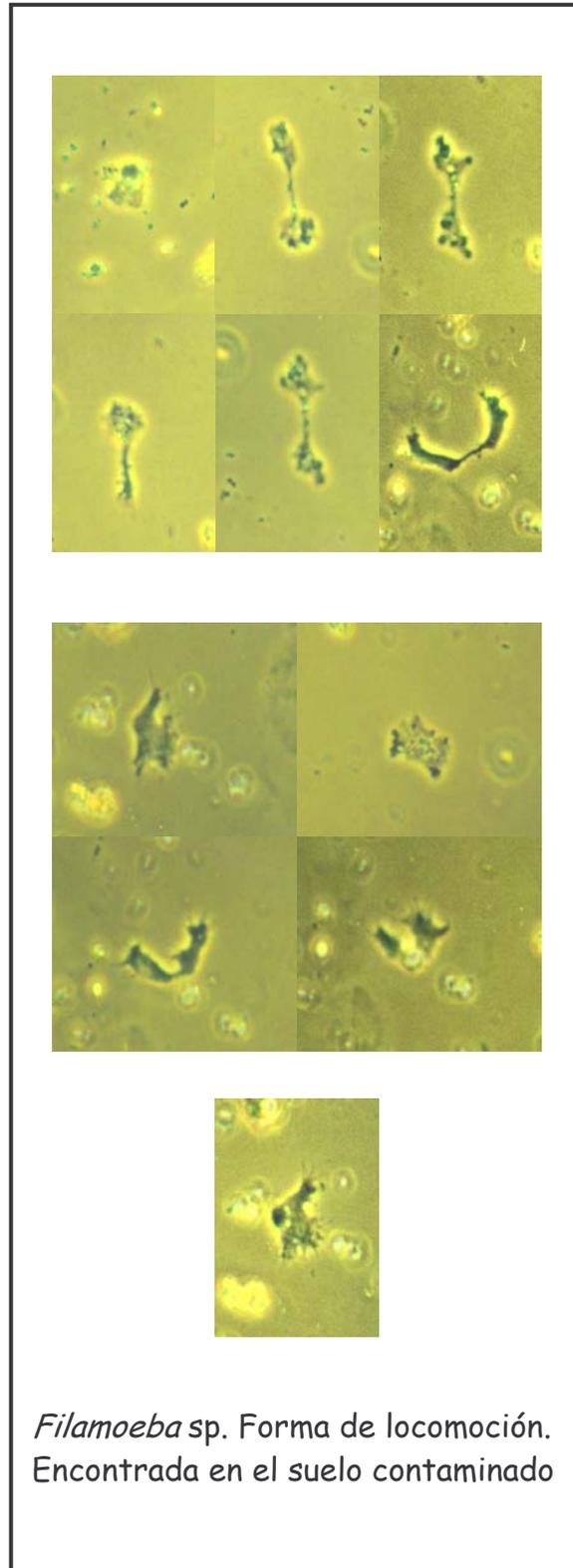
## FAMILIA ACANTHAMOEBIDAE



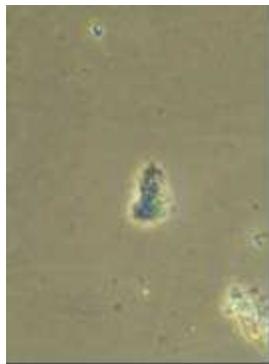
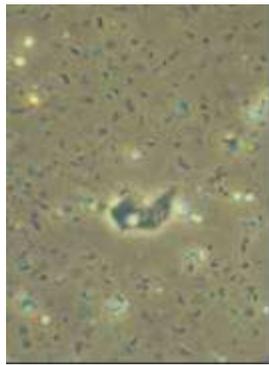
## FAMILIA COCHLIOPODIDAE



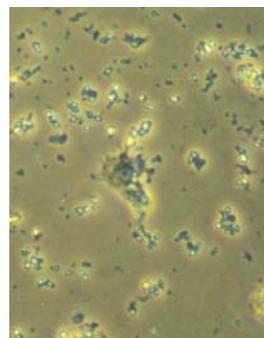
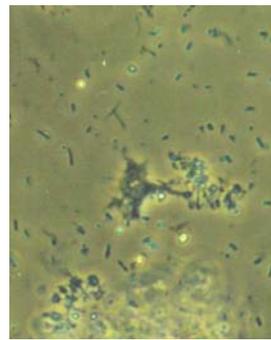
## FAMILIA ECHINAMOEBIDAE



## FAMILIA ECHINAMOEBIDAE

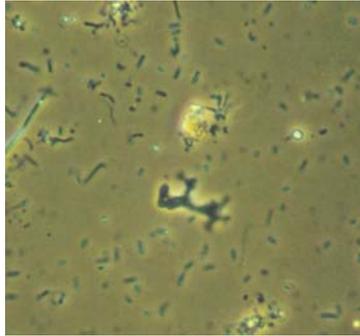


*Echinamoeba* sp. L 14  $\mu\text{m}$  y  
A 11  $\mu\text{m}$ . Observada en  
suelo contaminado.



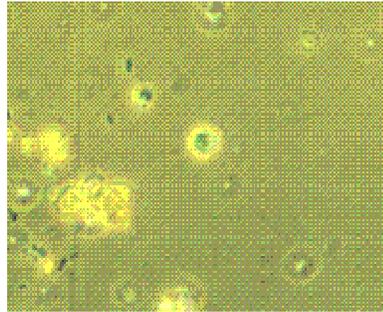
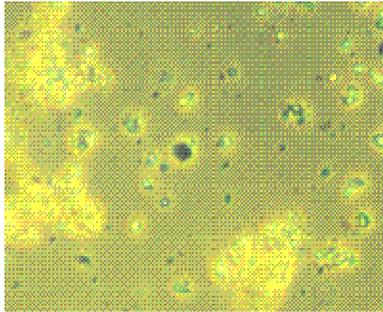
*Filamoeba nolandi* L 21  
 $\mu\text{m}$  y A 20  $\mu\text{m}$   
encontrada en los dos  
suelos.

## FAMILIA GEPHYRAMOEBIDAE

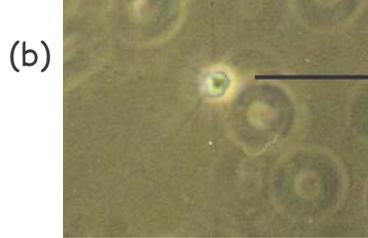
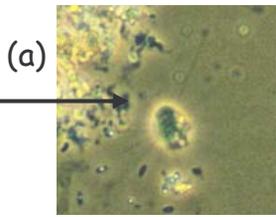


*Gephyramoeba* sp. . L 74.5  $\mu\text{m}$  y A 3  $\mu\text{m}$  Encontrada en el suelo con combustóleo.

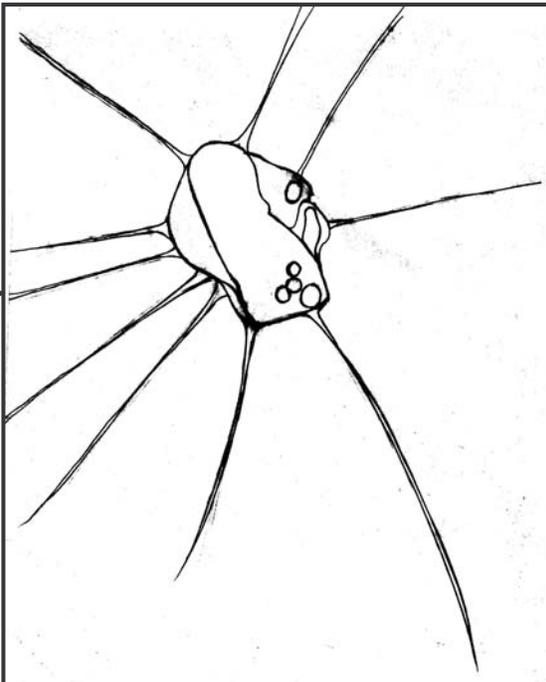
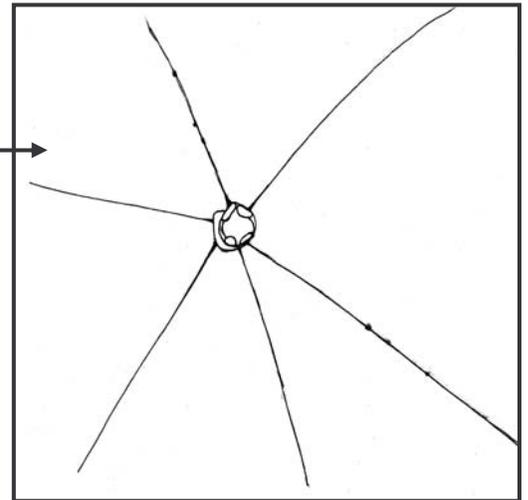
## FAMILIA NUCLEARIIDAE



*Nuclearia* sp L 40  $\mu\text{m}$ . Encontrada en suelo de cultivo.



(a) *Nuclearia* sp 1. 44  $\mu\text{m}$ . (b) *Nuclearia* sp 2. 40  $\mu\text{m}$ . Encontradas en suelo no contaminado



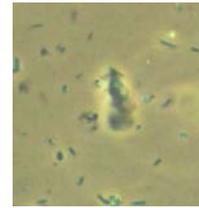
## FAMILIA PARAMOEBIIDAE



*Dactylamoeba  
Stella*, L 30  $\mu\text{m}$ , A  
14  $\mu\text{m}$  hallada en el  
suelo con  
combustóleo.

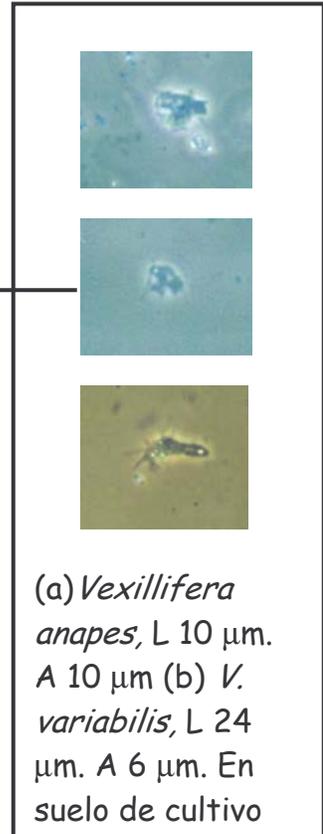
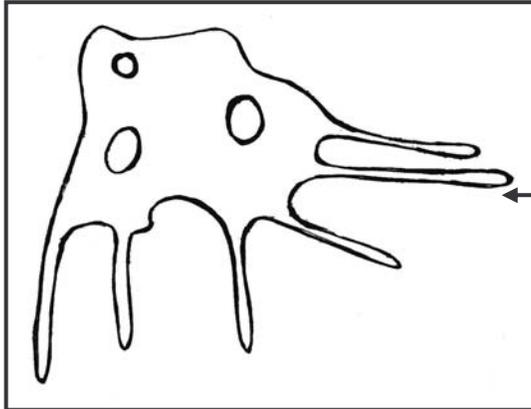


(a) *Mayorella  
cultura*, L 30  $\mu\text{m}$ . A  
14  $\mu\text{m}$  (b) *M.  
penardi*, L 26  $\mu\text{m}$ , A  
20  $\mu\text{m}$  (c) *M.  
riparia* L 21  $\mu\text{m}$ , A 8  
 $\mu\text{m}$ . Encontradas en  
el suelo de cultivo.



(a) *Mayorella  
spatula*, L 17  $\mu\text{m}$ . A 6  
 $\mu\text{m}$  (b) *M.  
microeruca*, L 18  $\mu\text{m}$ .  
A 16  $\mu\text{m}$ .  
Encontradas en suelo  
con contaminado

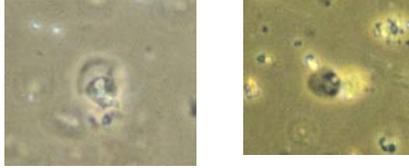
FAMILIA VEXILLIFERIDAE



FAMILIA THECAMOEBIDAE



## FAMILIA VANNELLIDAE

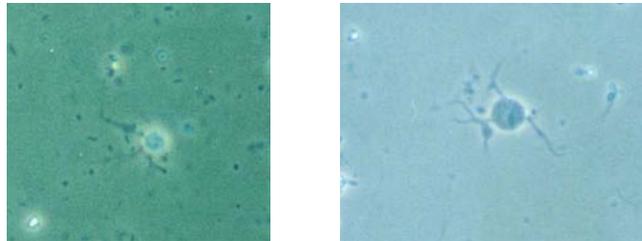


*Vanella platypodia*, L 10  $\mu\text{m}$ . A 11  $\mu\text{m}$ . Encontrada en suelo de cultivo.



*Platyamoeba stenopodia*, L 30  $\mu\text{m}$ . A 10  $\mu\text{m}$ .  
Encontrada en suelo de cultivo.

## FAMILIA VAMPYRELLIDAE



*Vampyrella* sp. , L 30  $\mu\text{m}$ . Encontrada en suelo de cultivo.