



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“ESTRUCTURA TRÓFICA DE LA COMUNIDAD  
DE CILIADOS Y FLAGELADOS EN UN SUELO  
DE CULTIVO CONTAMINADO CON  
COMBUSTÓLEO DE JALACINGO, VERACRUZ”**

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

LAURA MONDRAGÓN CAMARILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SALVADOR RODRÍGUEZ  
ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DR. RONALD FERRERA CERRATO  
DRA. NATHALIE CABIROL



MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de agosto del 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del (la) alumno (a) **MONDRAGÓN CAMARILLO LAURA** con número de cuenta 99220110 con la tesis titulada "**Estructura trófica de la comunidad de ciliados y flagelados en un suelo de cultivo contaminado con combustóleo de Jalacingo, Veracruz**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**:

Presidente: DRA. NATHALIE CABIROL  
Vocal: DR. HOMERO JULIO EUDES CAMPO ALVES  
Secretario: DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO  
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROSARIO SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
Suplente: DR. RONALD FERRERA CERRATO

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de octubre de 2011.



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México
- Al CONACyT (Registro No. 225463) y al SUBNARGEM
- A los miembros del Comité Tutor
  - DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
  - DR. RONALD FERRERA CERRATO
  - DRA. NATHALIE CABIROL

## **MÁS AGRADECIMIENTOS.....**

*Hay muchas personas especiales a las que quiero agradecer, su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.*

Un agradecimiento especial a mi familia principalmente a mis padres MARGARITA y DANIEL por su cariño, paciencia y por brindarme su apoyo incondicional.

A mis hermanos SERVANDO, ADRIÁN, BELEM, DANIEL Y ANTONIO por su cariño y su confianza.

A mi abuelita ENEDINA, que aunque ya no está con nosotros siempre la recordare, porque me ofreció su apoyo incondicional y su cariño a lo largo de mi vida.

A mis TÍOS, PRIMOS y los recién integrantes de la familia (los changuitos de mis sobrinos y primos).

Prof. Salvador gracias por su amistad, confianza y por su apoyo. Y sobre todo por compartir su conocimiento para el desarrollo de este trabajo. Gracias por darme la libertad de explorar este fascinante mundo de los pequeños organismos y sus interacciones que tienen grandes impactos en nuestra vida.

Prof. Ramón gracias por su amistad, confianza y compartir su conocimiento pero sobre todo por su maravillosa frase “el deporte no es menos importante que el trabajo en el laboratorio, sino todo lo contrario contrario, que es más”, gracias también por manipular mi mente para ir a jugar basquetbol todos los días.

Ana, Candis, Sandra y Tere (por orden alfabético; realmente fue por edades), gracias por, ayudarme, molestarme, apoyarme, molestarme (otra vez), acompañarme y nuevamente molestarme. Pero principalmente por ser mis amigas (compañeras jajaja) GRACIAS POR TODO!!!

También a Miguel por echarme porras siempre.

A la marabunta del laboratorio o sea la mismísima **“H. H.\* Banda Micro”** por hacer aun más grata la hora de los sagrados alimentos, ah!!! si en la hora del trabajo también, por todo su apoyo : Dra. Angy, Albin, Alfonso sin F, Jebus, al cuarteto de la muerte: Cruzeño, Semeña, Principe de Tepo, Jorge Herrera de la UNAN, a las gemelas malvadas: Sam y Anahi, Horaceo, Mareo, el Nobel Erit, Isabel Zombi, Rebe, Ximenova y a todos los que ya no están pero estuvieron en el laboratorio de microbiología de la UBIPRO. En este laboratorio el futbol, basquetbol, tochito, ajedrez, cartas y por supuesto la microbiología NOS UNEN.

También un agradecimiento especial a mis amigos que siempre me dan ánimos y aunque ya solo nos vemos en ocasiones especiales, deseo mantener su amistad por siempre, ya que esos momentos que pasamos juntos son inolvidables: Adriana, Aglaé, Ángeles, Argelia, David, Deysi, Ibette, Javier, Luigui, Lucho, Ricardo, Sergio, Sonia, Tanya, Viridiana y Yahomin.

A José Luis por que fue el que me consiguió el combustóleo ya que sin este, no se hubiera podido realizar este trabajo y muchos otros en el laboratorio.

A todos los integrantes del equipo de atletismo (el 50% son del lab. de microbiología), encabezado por el coach Flavio iiiya no me regañe coach!!!

**\* Honorable y Heroica**

A los miembros del jurado por sus oportunas observaciones que sirvieron para mejorar este trabajo.

- Dra. Nathalie Cabirol
- Dr. Homero Julio Eudes Campo Alves
- Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
- Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez
- Dr. Ronald Ferrera Cerrato

*.....dedicado a esos pequeños seres que nadie ve, pero que dominan al mundo  
(sí, los microorganismos)*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Hipótesis.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos particulares.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS	
Zona de estudio.....	8
Muestras de suelo.....	9
Extracto de suelo.....	9
Contaminación de suelo.....	10
Toma de muestra del microcosmos.....	11
Materia orgánica.....	12
Biomasa de <i>Medicago sativa</i> .....	12
Grupos tróficos.....	12
Análisis.....	13
RESULTADOS.....	14
Frecuencia de especies.....	21
Similitud entre la riqueza de especies.....	25
Grupos tróficos.....	27
Materia orgánica.....	31
Biomasa de <i>Medicago sativa</i> .....	32
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIÓN.....	41
REFERENCIAS.....	42
ANEXOS.....	50

## RESUMEN

La contaminación del suelo por hidrocarburos es un problema común debido a derrames accidentales o intencionales. La tolerancia a los compuestos tóxicos de los hidrocarburos induce la selectividad y la disminución de la diversidad microbiana. Los protozoos tienen suma importancia en este tipo de sistemas contaminados, porque son los principales depredadores de bacterias degradadoras de estos compuestos recalcitrantes. Esta relación depredador-presa acelera la degradación de hidrocarburos. La fitorremediación utiliza a las plantas para hacer más eficiente la degradación de los hidrocarburos pues en la rizósfera los exudados de la raíces estimulan la actividad microbiana. Sin embargo, el efecto que tiene la raíz sobre otras comunidades de microorganismos aún no es claro. El objetivo de este estudio fue determinar cómo influye el combustóleo y *Medicago sativa* en la estructura trófica de la comunidad de ciliados y flagelados. Para ello se diseñó un experimento de microcosmos en el que se tuvieron 4 tratamientos: suelo con combustóleo SC, suelo con planta SP, suelo con planta con combustóleo SPC y el suelo control S. Se identificaron un total de 91 especies de ciliados y flagelados en todos los tratamientos. En el SC fue donde se encontró mayor riqueza de especies (50 spp); en el S, SP y SPC la riqueza de especies fue de 37. Los protozoos fueron más abundantes en los tratamientos con *Medicago sativa*, lo que nos indica que el efecto de la raíz de esta planta fue positivo para la comunidad de ciliados y flagelados. En el suelo sin combustóleo encontramos mayor número de grupos tróficos (5 en el S y 4 en el SP), mientras que en los SC y SPC solo encontramos 2 grupos tróficos. Lo que nos indica que el combustóleo reduce la complejidad de las redes tróficas del suelo. Por otro lado, hubo un incremento en la abundancia del grupo bacterívoro en los tratamientos con combustóleo, lo que sugiere que la comunidad de protozoos se está alimentando de bacterias tolerantes y degradadoras de hidrocarburos.



## ABSTRACT

Soil contamination due to accidental or intentional spills of hydrocarbons is a common problem in southern Mexico. Toxic hydrocarbon compounds induce selection of tolerant organisms reducing microbial diversity. Soil protozoa are very important for hydrocarbon degradation because of preying upon bacteria that degrade these recalcitrant compounds. Phytoremediation is the use of plants to increase the effectiveness of hydrocarbons degradation by means of root exudates that stimulate microbial activity. However, the root's effect on protozoan communities is still unclear. The objective of this study was to determine how fuel oil No.6 and *Medicago sativa* affect the trophic structure of the soil ciliates and flagellates community. To do this we designed a microcosm experiment with 4 treatments: fuel oil No.6 soil (SC), plant soil (SP), fuel oil No.6 plus plant soil (SPC) and the control soil (S). We identified a total of 91 species of ciliates and flagellates in all treatments. We found that SC showed the greatest species richness (50 spp), followed by S, SP and SPC with 37 species each. Protozoa were more abundant in treatments with *Medicago sativa*, indicating that the root effect of this plant was positive for ciliates and flagellates community. We found a greater number of trophic groups in the non-contaminated soils, (5 in the S and 4 in the SP), while the SC and SPC showed only two trophic groups. This indicates that fuel oil contamination reduces the complexity of soil trophic networks. On the other hand, the abundance increase of the bacterivore group in all fuel oil treatments, suggests that protozoa community is feeding on bacteria able to thrive and degrade hydrocarbons.



## INTRODUCCIÓN

Las emergencias ambientales ocurridas en México han ocasionado lamentables daños al ambiente, según la Profepa el combustóleo es una de las principales sustancias derivadas de los hidrocarburos involucradas en el 5.39% de emergencias ambientales en nuestro país (Sarmiento *et al.*, 2003). El combustóleo está constituido por una mezcla compleja de hidrocarburos: parafinas (n-alcanos, alcanos ramificados, cicloalcanos), compuestos alquil monoaromáticos (tolueno, etilbenceno), poliaromáticos (hidrocarburos poliaromáticos (PAH); fenantreno, pireno, naftaleno, etcétera); y compuestos con nitrógeno (N) y azufre (S). Los PAH son insolubles, difícilmente degradables y por tanto persistentes en el ambiente. Presentan gran afinidad por los tejidos grasos lo que favorece a su bioacumulación y permanencia por muchos años (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007).

Estos hidrocarburos causan alteraciones en las propiedades químicas, físicas y biológicas de los suelos, cuando están en contacto directo con estos contaminantes (Sangabriel *et al.*, 2006). En cuanto a las características químicas principalmente aumentan la materia orgánica (MO) y disminuyen el pH (Ortinez *et al.*, 2003). Dentro de las propiedades físicas que afectan están: la estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados, aumento de la retención del agua en la capa superficial y potencial hídrico.

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



La mayoría de estos compuestos orgánicos pueden ser tóxicos para los microorganismos; la tolerancia microbiana a la presencia de hidrocarburos induce la selectividad y la disminución de la diversidad (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). El mantenimiento de las funciones del suelo requiere una comprensión de la respuesta de las comunidades microbianas al estrés y a las perturbaciones. La disminución de la diversidad microbiana podría llevar a una disminución en la estabilidad del suelo en caso de fluctuaciones ambientales de este tipo (Girvan *et al.*, 2005).

Generalmente los microorganismos que tienen la capacidad de degradar los compuestos contaminantes son bacterias y algunas especies de hongos; aunque se ha observado que algunos protozoos toleran la toxicidad de estos compuestos. Algunos estudios indican que los protozoos tienen un papel importante en la ecología microbiana de la degradación de contaminantes y en los métodos de biorremediación (Stoeck y Edgcomb, 2010). Esto es, debido a su importancia como controladores de las poblaciones bacterianas, mediante la depredación regulan el ciclo de los nutrientes del suelo, y participan indirectamente en la fertilización al aumentar la mineralización de C y N (Rutherford y Juma, 1992); no sólo aceleran el reciclaje de los nutrientes, también aumentan la actividad de la población bacteriana (Kuikman *et al.*, 1990), por lo que se acelera la degradación de los contaminantes.

Rogerson y Bengner (1983), observaron el aumento de la degradación del petróleo crudo cuando las bacterias fueron depredadas por el ciliado *Colpidium colpoda* en un cultivo aerobio *in vitro*. Este aumento en la mineralización del petróleo fue estimulado por el crecimiento bacteriano en respuesta a la depredación por el ciliado.

Mattison y Haramaya (2001), establecieron un modelo de una cadena trófica para investigar la influencia del ramoneo de flagelados sobre las bacterias (en cultivo) que



degradan tolueno. La tasa de tolueno consumido por *Pseudomonas* sp. Cepa PS+ fue significativamente más alta en presencia del flagelado bacterívoro *Heteromita globosa*. Lo que sugiere un papel importante de los flagelados en los procesos de biorremediación. También, Del Paño *et al.*, (2005) revisaron y analizaron los cambios de las comunidades microbianas en función de la concentración de hidrocarburos en un estudio de microcosmos, donde la estructura de la comunidad en los suelos contaminados fue diferente de la del control. Los cambios en la estructura de la comunidad de los suelos dependieron de la cantidad del contaminante.

Una de las estrategias para la remediación de suelos contaminados es la fitorremediación la cual se define como el uso de plantas y su asociación con los microorganismos para la limpieza de sitios contaminados. Esta se basa en el uso de los procesos naturales de las plantas y los microorganismos de la rizósfera que degradan y secuestran contaminantes orgánicos e inorgánicos (Pilon-Smits, 2005). El primer mecanismo que envuelve la fitorremediación de los hidrocarburos es considerar que la biodegradación se incrementa por la estimulación de la actividad microbiana debida a los exudados de la raíz (fitoestimulación) o efecto la rizósfera (Tang *et al.*, 2010).

Múltiples cambios ocurren en el suelo en presencia de raíces que dan como resultado cambios en sus características químicas, lo cual modifica la composición de los microorganismos, y aumenta la actividad microbiana (Joner y Leyval, 2003). Este incremento en la actividad de los microorganismos depende de la cantidad de C excretada por las raíces de las plantas (Xiaoyun *et al.*, 2007).

Bonkowski y Brandt (2002) encontraron que *Acanthamoeba* sp. cambia la composición de la comunidad bacteriana y también afecta significativamente la morfología de la raíz de *Lepidium sativum* cuando están presentes a partir de germinación de semillas. También observaron que la liberación de nutrientes



procedentes del ramoneo de la biomasa bacteriana es sólo una faceta de las interacciones planta-protozoos.

Mondragón-Camarillo (2007) realizó un estudio del efecto del combustóleo en la comunidad de ciliados y flagelados en un suelo contaminado. En él se analizó la riqueza de especies y los grupos tróficos; y se encontró que hubo un cambio en la comunidad de estos protozoos. Los resultados sugieren que la riqueza de especies por sí misma no es un indicador fiable del efecto del combustóleo. No obstante, el análisis de los grupos tróficos ofrece un mejor parámetro para estimar el efecto de este tóxico. Sin embargo este estudio solo fue correlativo y no comprueba que el cambio observado se deba al combustóleo y no a la variación normal de las comunidades de protozoos. Las observaciones anteriores llevaron a plantear las siguientes preguntas **¿Cómo influye el combustóleo sobre la estructura trófica de la comunidad de ciliados y flagelados en un estudio de microcosmos? y ¿Cuál es el efecto de *Medicago sativa* sobre la estructuración de la comunidad de estos protozoos?**



## HIPÓTESIS

La abundancia de los grupos tróficos de ciliados y flagelados disminuirá en los tratamientos con combustóleo.

El combustóleo tendrá un efecto positivo sobre el grupo bacterívoro con un incremento de la riqueza de especies que lo conformen.

*Medicago sativa* influirá en el rápido desarrollo de los microorganismos por lo que habrá mayor riqueza de especies y ayudara a restablecer los grupos tróficos.

## OBJETIVO GENERAL

- Determinar cómo influye el combustóleo en la estructura trófica de la comunidad de ciliados y flagelados del suelo, así como determinar la influencia de *Medicago sativa* en la estructuración de esa misma comunidad.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el tiempo generacional de la comunidad de ciliados y flagelados en el suelo de cultivo.
- Determinar la riqueza de especies de ciliados y flagelados en el suelo en los tratamientos: suelo con combustóleo **SC**, suelo con planta **SP**, suelo con planta con combustóleo **SPC** y suelo control **S**.
- Establecer bibliográficamente a qué grupo trófico pertenecen las especies de ciliados y flagelados de los diferentes tratamientos.
- Comparar la riqueza de especies y los grupos tróficos de los diferentes tratamientos.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Zona de estudio**

El municipio de Jalacingo está ubicado en la zona centro del estado de Veracruz, en las Coordenadas 19°48´ N y 97°18´ W, a una altitud de 1944 msnm (Fig.1). Limita al Norte con el municipio de Tlapacoyan; al Este con Atzalan y Altotonga; al Sur con Perote; al Oeste con el Estado de Puebla. Su distancia aproximada al Noroeste de la capital del estado es de 65 km por carretera. El clima del municipio es templado-húmedo con una temperatura promedio de 13.9 °C; la precipitación promedio anual es de 2,029.5 mm. El suelo es de tipo andosol, feozem y luvisol, el primero se ha formado a partir de ceniza volcánica, el segundo tiene una capa superficial rica en materia orgánica, es oscura y el tercero se caracteriza por su acumulación de arcilla en el subsuelo. El mayor porcentaje de esta superficie se utiliza en agricultura y ganadería (<http://www.emexico.gob.mx/work/EMM04/Veracruz/index.html>). La parcela esta situada en el Ejido Orilla del Monte, 19° 35' 16" latitud y 097° 21' 06" longitud, a una altitud de 2410 msnm, en la carretera pavimentada de Los Húmeros a Perote. Colinda al Norte (98.64 m) con la carretera pavimentada de Los Húmeros, al Sureste (229.06 m) con parcela 871, al Suroeste (97.15 m) con el ejido Fríjol colorado, al noroeste (230 m) con parcela 858.



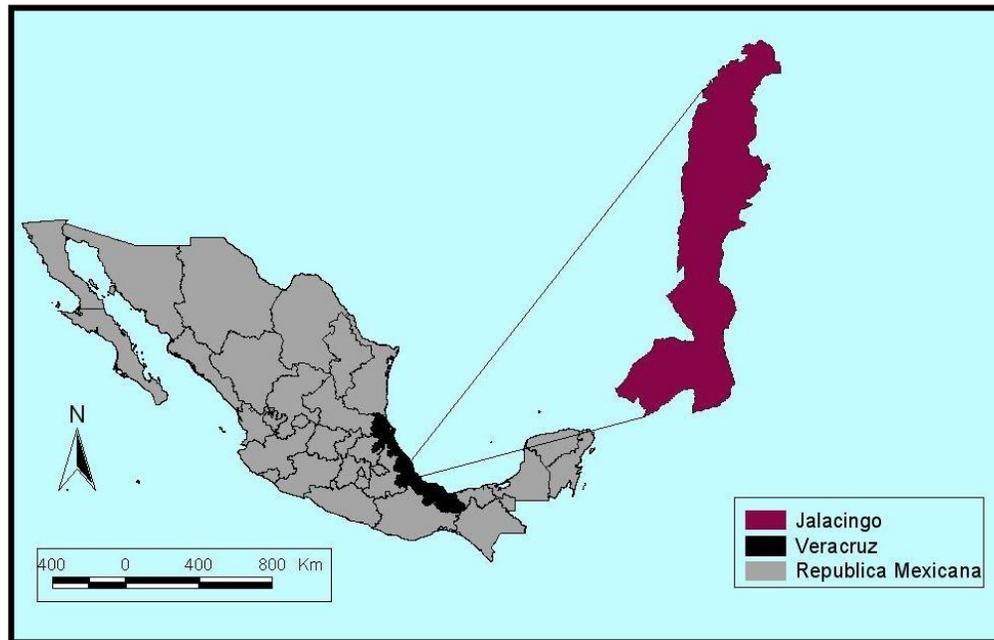


Fig. 1. Jalisco, Veracruz.

### **Muestras de suelo**

El suelo fue colectado de una parcela en donde la textura es de tipo franco, pH 6.6 (Sangabriel *et al.*, 2006) y 3.1% de materia orgánica. Las muestras se tomaron de 6 lugares diferentes de la parcela con una profundidad de 0 a 15 cm, éstas se tamizaron (2mm de diámetro) y homogenizaron para así obtener una muestra compuesta (Margesin *et al.*, 2005). La muestra compuesta se depositó en bolsas de polietileno autosellables, las cuales se transportaron al laboratorio de Microbiología de la FES-Iztacala.

### **Extracto de suelo**

Se preparó con 200g de suelo al cual se le agregó 1 L de agua destilada, se homogenizó y se colocó en baño María a 60 °C durante 2 h, se filtró a una temperatura aproximada de 40 °C, posteriormente se esterilizó y refrigeró para su posterior uso. A este extracto se le llamó la solución madre y la solución de trabajo en todos los casos fue la dilución de 1:5 en agua destilada estéril.



## **Contaminación del suelo**

La contaminación del suelo por combustóleo se realizó con una concentración de 50,000 ppm (debido a que esa concentración fue reportada en el suelo donde hubo un derrame cercano a la zona de estudio) y se hizo con ayuda de un solvente orgánico (hexano) para hacer más soluble el combustóleo, debido a que su viscosidad es elevada. El combustóleo se agregó en un recipiente (12cm de diámetro por 14.5 de altura) al cual se le agregaron 75ml de hexano para rebajar la viscosidad del combustóleo, posteriormente el suelo fue añadiéndose poco a poco hasta los 300 g y se revolvió hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se dejó evaporar el hexano por 48 h. La mezcla final se humedeció con extracto de suelo hasta llegar al 60% de su capacidad de campo, la humedad se mantuvo constante durante todo el periodo experimental.

Se elaboraron 35 microcosmos por tratamiento (Tabla 1), los cuales se programaron para muestrearse por quintuplicado los días 1, 5, 9, 13, 17 y 25. Estos días se determinaron después de la estimación el tiempo generacional de ciliados y flagelados del suelo de cultivo. Los tratamientos fueron suelo con combustóleo SC, suelo con planta SP, suelo con planta con combustóleo SPC y suelo control S (al cual solo se le agrego extracto de suelo). También se probó el efecto del hexano en las comunidades de protozoos en condiciones de microcosmos. Se procesaron muestras de 10 gr de suelo de las 5 repeticiones de cada uno de los tratamientos. Cada microcosmos fue desechado después de usarse. El efecto del hexano en el cambio ocurrido en la comunidad de ciliados y flagelados se realizó un día después de la contaminación y a los 25 días, solo para evaluar el impacto en los grupos tróficos. En total se procesaron 150 microcosmos.

A los tratamientos en donde crecería *Medicago sativa* se les agregaron 40 semillas de dicha planta en cada microcosmos y se dejaron pasar 30 días para que se

estableciera *M. sativa*, a partir de ese día comenzó el periodo experimental (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos de los microcosmos				
Tratamientos				
<p><b>Suelo control</b> <b>S</b> 5 repeticiones por día. 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25.</p>	<p><b>Suelo con combustóleo</b> <b>SC</b> 5 repeticiones por día. 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25.</p>	<p><b>Suelo con planta (<i>Medicago sativa</i>)</b> <b>SP</b> 5 repeticiones por día. 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25.</p>	<p><b>Suelo con planta (<i>Medicago sativa</i>) con combustóleo</b> <b>SPC</b> 5 repeticiones por día. 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25.</p>	<p><b>Suelo con hexano</b> <b>H</b> 5 repeticiones por día. 1, 25.</p>

### Toma de muestra del microcosmos

De cada microcosmos se tomaron 10g de suelo, los cuales se colocaron en una caja Petri a la que se agregó de 10 ml de extracto de suelo (1/10), y se extrajeron de 8 a 10 ml ejerciendo presión con un dedo para obtener a los ciliados y flagelados (método del suelo húmedo de Bamforth, 1992).

Se realizaron 4 preparaciones de cada muestra para observarlas en el microscopio de contraste de fases e identificar morfológicamente a los ciliados y flagelados, para lo cual se utilizaron las claves de Patterson, (1996); Lee *et al.*, (2000); y los artículos Myl'nikov *et al.*, (2004) y Karpov *et al.*, (2003).

Debido a la poca cantidad de organismos presentes en el suelo control los 8 a 10 ml se colocaron en tubos Eppendorf con capacidad de 2 ml y fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos, se resuspendió la pastilla en un 1 ml de agua destilada estéril, del que se realizaron preparaciones para observarlas en el microscopio para determinar la riqueza de especies desde el punto de vista morfológico.

### **Materia orgánica**

La determinación del porcentaje de materia orgánica se realizó por el método de Walkley y Black que consiste en destruir la materia orgánica oxidándola con una mezcla ácida de dicromato de potasio. Se determinó la materia orgánica al inicio y al final del experimento que fueron los días 1 y 25 de cada microcosmos.

### **Biomasa total**

La biomasa de las plantas se determinó al inicio y al final del experimento que fueron los días 1 y 25, de los microcosmos SP y SPC, se lavó la raíz y se dejó secar, se registró el peso total de las plantas.

### **Grupos tróficos**

Se clasificó a los organismos dependiendo de sus preferencias alimentarias, determinadas con base en la literatura (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos tróficos (modificado de Pratt y Cairns, 1985).		
<b>Grupo trófico</b>	<b>Tipo de alimento que consumen</b>	<b>Ejemplos de ciliados y flagelados</b>
Alguívoro-bacterívoro	Algas y bacterias	<i>Platyophrya</i>
Bacterívoro	Bacterias	<i>Bodo</i> , <i>Cercomonas</i> , <i>Spumella</i>
Eucariotrófico	Organismos eucariontes	<i>Blepharisma</i>
Mixotrófico	Autótrofos y heterótrofos	<i>Chlamydomonas</i> , <i>Ochromonas</i>
Omnívoro	Variedad, bacterias algas, detritus.	<i>Homalozoon</i>
Osmotrófico	Sustancias disueltas en el medio	<i>Distigma proteus</i> , <i>Astasia parvula</i>

## **Análisis**

Se analizó la similitud dentro de tratamientos y entre tratamientos mediante el índice de similitud de Sørensen con el programa PCORD© versión 4 para Windows© (McCune y Mefford, 1999).

Se hizo una prueba de Ji-cuadrada, que se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $P < 0.05$ ).



## RESULTADOS

Se identificaron 91 especies de ciliados y flagelados, que pertenecen a 39 géneros y 29 familias en todos los tratamientos S, SC, SP, SPC y H (Tabla 3).

Tabla 3. Riqueza de especies de ciliados y flagelados en los diferentes tratamientos.			
<b>Tratamientos</b>	Ciliados	Flagelados	No. total de especies
<b>S</b>	15	22	37
<b>SC</b>	5	45	50
<b>SP</b>	10	27	37
<b>SPC</b>	7	30	37
<b>H</b>	5	18	23

Los flagelados *Bodo caudatus*, *Spumella dangeardii* y *Spumella cilíndrica* se presentaron en todos los tratamientos. Por parte del grupo de ciliados las especies *Colpoda cucullus* y *Plesiocaryon elongatum* también se presentaron en todos los tratamientos, Tabla 4.

Las especies *Distigma proteus*, *Astasia parvula* y *Astasia sp1* solo se encontraron temporalmente ya que sólo fueron observadas en el SC y en los días 5 y 9.



Tabla 4. Especies de ciliados y flagelados encontrados en todos los tratamientos. Suelo control (S), Suelo con combustóleo (SC), Suelo con Planta (SP), Suelo con Planta con combustóleo (SPC), Suelo con Hexano (H) y los Grupos Tróficos (GT) a los que pertenecen (AB-Alguívoro-Bacterívoro, B-Bacterívoro, E-Eucariotrófico, M-Mixotrófico, O-Omnívoro, Os-Osmotrófico).

FAMILIAS	ESPECIES	S	S.C	S.P	S.P.C	H	GT
PEDINELLACEAE	<i>Actinomonas mirabilis</i>	+		+			B
SILUANIACEAE	<i>Adriamonas sp</i>	+			+	+	B
HETEROMITIDAE	<i>Allantion sp</i>		+	+	+	+	B
APUSOMONADIDAE	<i>Amastigomonas sp</i>		+				B
ASTASIACEAE	<i>Astasia parvula</i>		+				Os
ASTASIACEAE	<i>Astasia sp1</i>		+				Os
ASTASIACEAE	<i>Astasia sp2</i>			+			Os
BLEPHARISMIDAE	<i>Blepharisma sp</i>	+					E
BODONIDAE	<i>Bodo angustus</i>		+	+	+		B
BODONIDAE	<i>Bodo caudatus</i>	+	+	+	+	+	B
BODONIDAE	<i>Bodo celer</i>		+	+	+	+	B
BODONIDAE	<i>Bodo designis</i>	+		+	+	+	B
BODONIDAE	<i>Bodo lens</i>		+				B
BODONIDAE	<i>Bodo minimus</i>	+	+				B
BODONIDAE	<i>Bodo ovatus</i>	+					B
BODONIDAE	<i>Bodo parvus</i>			+			B
BODONIDAE	<i>Bodo rostratus</i>		+				B
BODONIDAE	<i>Bodo saltans</i>			+			B
BODONIDAE	<i>Bodo sp1</i>		+				B
BODONIDAE	<i>Bodo sp2</i>		+				B
BODONIDAE	<i>Bodo sp3</i>				+		B
BODONIDAE	<i>Bodo triangularis</i>		+				B
CAFETERIACEAE	<i>Cafeteria sp</i>	+			+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas bodo</i>		+		+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas cometa</i>				+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas crassicauda</i>			+	+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas fatiga</i>				+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas lenta</i>			+	+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas metabolicus</i>			+	+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas minimus</i>		+			+	B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas sp1</i>		+				B



CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas sp2</i>		+				B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas sp3</i>		+				B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas sp4</i>		+				B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas sp5</i>		+	+	+		B
CERCOMONADIDAE	<i>Cercomonas sp6</i>		+				B
CHLAMYDOMONADACEAE	<i>Chlamydomonas sp</i>			+		+	M
COLPODIDAE	<i>Colpoda cucullus</i>	+	+	+	+	+	B
COLPODIDAE	<i>Colpoda steinii</i>		+	+	+		B
CYCLIDIIDAE	<i>Cyclidium glaucoma</i>	+					B
CYRTOLOPHOSIDIDAE	<i>Cyrtolophosis bursaria</i>			+			B
CYRTOLOPHOSIDIDAE	<i>Cyrtolophosis elongata</i>	+		+	+	+	B
CYRTOLOPHOSIDIDAE	<i>Cyrtolophosis mucicola</i>	+		+	+	+	B
BODONIDAE	<i>Dimastigella sp</i>	+					B
ASTASIACEAE	<i>Distigma proteus</i>		+				O <sub>s</sub>
MICROTHORACIDAE	<i>Drepanomonas dentata</i>	+					B
EPICLINTIDAE	<i>Epiclintes sp</i>	+		+			B
	<i>Euglenido</i>		+	+	+		
EUGLENACEAE	<i>Euglenopsis sp</i>		+		+		B
	<i>Flagelado sp1</i>			+	+		
GONIOMONADACEAE	<i>Goniomonas truncata</i>					+	B
HETEROMITIDAE	<i>Heteromita globosa</i>	+	+		+		B
HETEROMITIDAE	<i>Heteromita sp</i>	+	+	+	+	+	B
HOMALOOZONIDAE	<i>Homalozoon sp</i>	+					O
METOPIDAE	<i>Metopus sp</i>	+					B
CODONOSIGIDAE	<i>Monosiga ovata</i>			+			B
CHROMULINACEAE	<i>Oikomonas mutabilis</i>	+					B
CHROMULINACEAE	<i>Oikomonas ocellata</i>		+				B
CHROMULINACEAE	<i>Oikomonas rostratum</i>		+				B
CHROMULINACEAE	<i>Oikomonas sp</i>		+				B
CHROMULINACEAE	<i>Oikomonas steinni</i>	+					B
CHROMULINACEAE	<i>Oikomonas termo</i>	+	+	+	+		B
PARAPHYSOMONADACEAE	<i>Paraphysomonas sp</i>	+	+				B
PERANEMIDAE	<i>Peranema sp</i>		+				B
ASTASSIDAE	<i>Petalomonas sp</i>					+	B
PLATYOPHRYIDAE	<i>Platyophrya sp</i>	+		+			AB
PLATYOPHRYIDAE	<i>Platyophrya vorax</i>					+	AB



CYRTOLOPHOSIDIDAE	<i>Plesiocaryon elongatum</i>	+	+	+	+	+	B
CYRTOLOPHOSIDIDAE	<i>Plesiocaryon sp</i>			+	+		B
CHLAMYDOMONADACEAE	<i>Polytoma sp</i>	+	+	+	+	+	Os
HETEROMITIDAE	<i>Proleptomonas sp</i>		+	+	+	+	B
HETEROMITIDAE	<i>Protaspis gemmifera</i>	+	+				B
HETEROMITIDAE	<i>Protaspis sp</i>		+		+	+	B
BODONIDAE	<i>Rhynchobodo longiciliatus</i>				+		B
BODONIDAE	<i>Rhynchobodo sp</i>	+	+	+		+	B
BODONIDAE	<i>Rhynchomonas nasuta</i>		+	+	+	+	B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella cylindrica</i>	+	+	+	+	+	B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella dangeardii</i>	+	+	+	+	+	B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella elongata</i>	+	+				B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella globulus</i>	+	+				B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella sociales</i>	+	+		+	+	B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella sp 1</i>		+				B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella sp2</i>		+				B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella sp3</i>			+			B
CHROMULINACEAE	<i>Spumella sp4</i>			+	+		B
SPIROFILIDAE	<i>Stichotricha sp</i>			+			B
OXYTRICHIDAE	<i>Tachysoma sp</i>	+					B
TETRAHYMENIDAE	<i>Tethahymena piriformis</i>		+				B
TETRAHYMENIDAE	<i>Tetrahymena sp</i>	+	+		+		B
UROSTYLIDAE	<i>Uroleptus sp</i>	+					B
UROTRICHIDAE	<i>Urotricha sp</i>	+					B



## **Suelo Control (S)**

En el suelo control se encontraron mayor número de especies de flagelados que de ciliados (Fig.2A). Se encontraron los géneros de ciliados *Cyrtolophosis*, *Plesiocaryon*, *Metopus*, *Colpoda*, *Blepharisma*, todos estos con baja frecuencia; así como también los géneros de flagelados *Bodo*, *Oikomonas*, *Spumella*, *Rynchobodo*, estos con mayor frecuencia de aparición.

## **Suelo Contaminado (SC)**

Con respecto al SC el día 1 después de la contaminación no se detectaron ciliados y flagelados, observándose nanoflagelados y bacterias (Fig.2B). Cuatro días después de la contaminación se empezó a establecer la comunidad de flagelados; la comunidad de ciliados y flagelados se estableció hasta el día 9, se encontró mayor riqueza de especies de flagelados que de ciliados. Este patrón se mantuvo durante todo el periodo experimental. Este tratamiento fue el que tuvo mayor riqueza de especies.

En el SC el grupo de flagelados Euglenidos está representado, por los géneros *Distigma*, *Astasia* y *Euglenopsis*. También se encuentran géneros como *Bodo*, *Cercomonas*, *Rynchobodo*, *Heteromita*, *Oikomonas* y *Spumella*; respecto a los ciliados se encontró el género *Plesiocaryon*, pero con baja frecuencia. También en el suelo contaminado de los días 13, 17, 21 y 25 se observaron ciliados del género *Colpoda* siendo un género con alta frecuencia durante este periodo.

## **Suelo con Planta (SP)**

En este tratamiento hubo un incremento de la frecuencia de especies de ciliados y flagelados pero la riqueza de especies se mantuvo igual a la del S, pero fue menor que la del SC (Fig.2C). En todos los periodos del muestreo están presentes especies

de ciliados de los géneros *Colpoda*, *Plesiocaryon* y *Cyrtolophosis* (bacterívoros) siendo estos últimos los más frecuentes durante todo el periodo de muestreo. La raíz de la planta tiene una influencia positiva en la composición de la comunidad de estos ciliados.

Con respecto a la comunidad de flagelados se encontraron los géneros *Bodo* y *Cercomonas* (con varias especies), además de *Oikomonas*, *Spumella*, *Proleptomonas* y *Rynchomonas*, todos ellos bacterívoros. Además en este tratamiento se promovió el establecimiento de *Chlamydomonas sp* que apareció en todos los muestreos y con alta frecuencia, probablemente porque la presencia de la planta *Medicago sativa* mejora las condiciones que favorecen el establecimiento de esta especie, al igual que la comunidad de ciliados que no se había presentado en el S y SC.

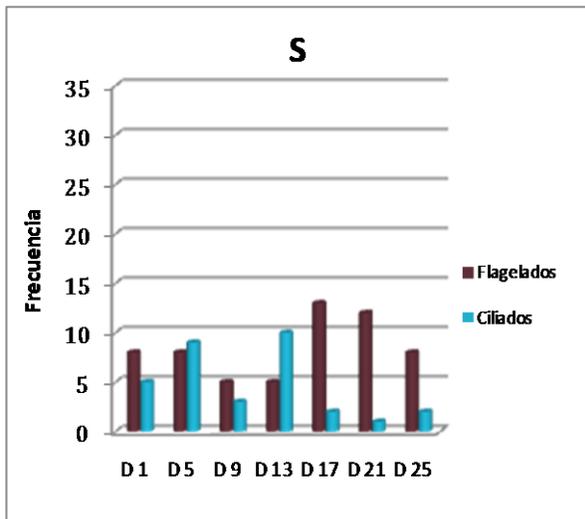
### **Suelo con Planta con combustóleo (SPC)**

En este tratamiento también hubo un incremento en la frecuencia de especies (Fig. 2D). Al igual que en el SP también se estableció la misma comunidad de ciliados *Plesiocaryon*, *Cyrtolophosis* y *Colpoda*, pero a diferencia del SP el género *Colpoda* fue el más común y frecuente en todo el periodo de muestro.

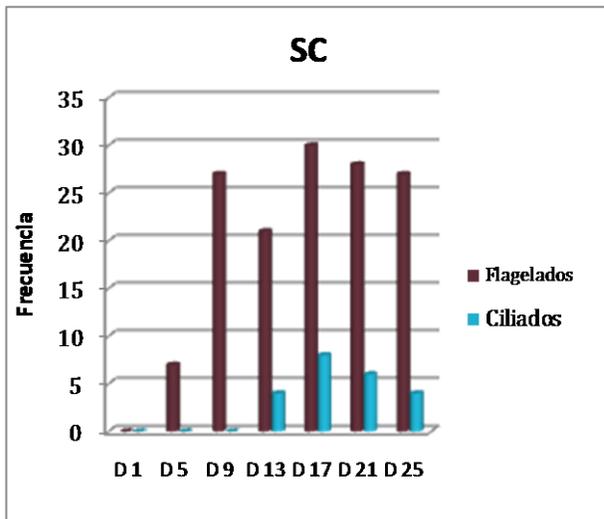
La comunidad de flagelados está representada principalmente por los géneros *Bodo*, *Cercomonas* (con varias especies), *Rynchomonas* y *Adriamonas* (bacterívoros), este último género es muy frecuente.



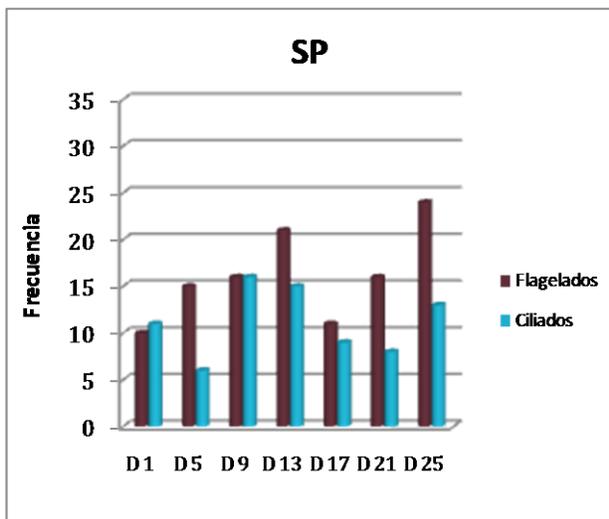
A



B



C



D

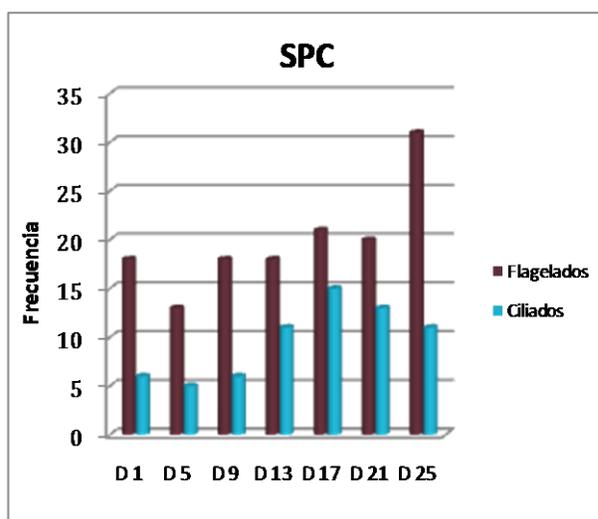


Fig. 2. Riqueza de especies de ciliados y flagelados de todo el periodo experimental. D- día. A- Suelo control **S**, B-Suelo contaminado **SC**, C-suelo con planta **SP**, D- suelo con planta contaminado **SPC**.

## FRECUENCIA DE ESPECIES

En el Suelo control solo hubo una especie dominante que fue el flagelado *Spumella dangeardii*, los flagelados *Bodo caudatus*, *Spumella cylindrica* y el ciliado con mayor frecuencia *Cyrtolophosis mucicola* fueron los comunes y hubo mayor porcentaje de especies raras. En este suelo la proporción de dominantes comunes y raras fue de 3, 22 y 75% respectivamente (Fig. 3A).

En cuanto al SC dentro de las especies dominantes se encontraron los flagelados *Spumella cylindrica*, *Spumella socilis* y *Spumella dangeardii*; la especie de ciliado *Colpoda steinii* paso de ser tan rara que no pudimos observarla en el suelo control a dominante en el SC; *Colpoda cucullus* paso de rara en el S a común en el suelo con combustóleo. En este tratamiento hubo menos especies raras 66% y aumentó la proporción de comunes a 26% y de dominantes a 8% (Fig. 3B).

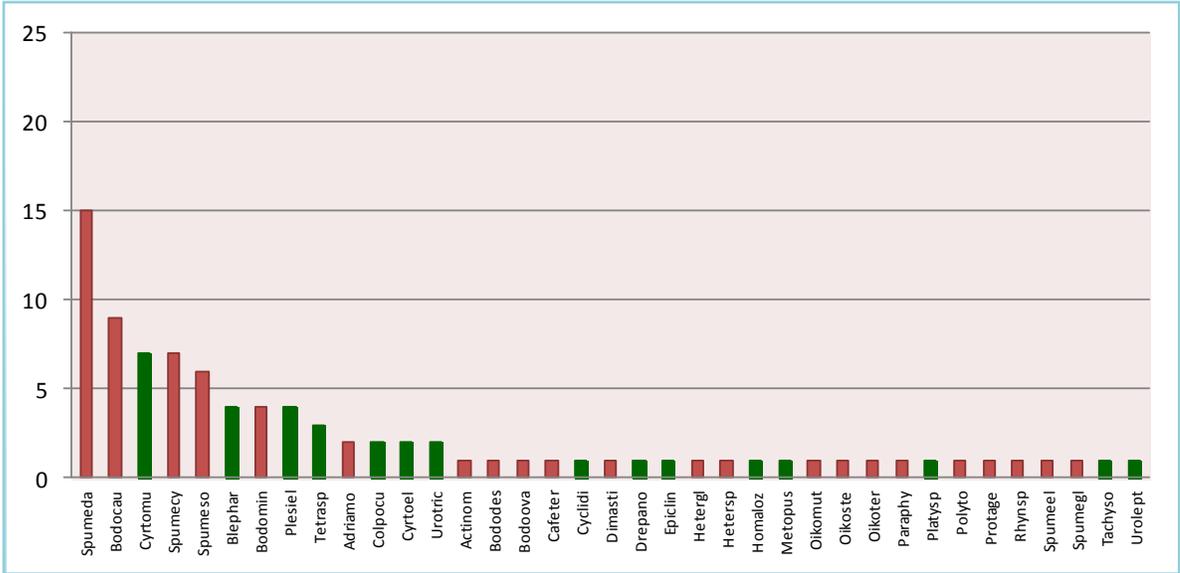
En los tratamientos con *Medicago sativa* aumentó la frecuencia de especies. En el SP cambió la dominancia de grupos, por lo que el grupo dominante fueron los ciliados; las especies de estos con mayor frecuencia fueron *Cyrtolophosis elongata*, *Plesyocarion elongatum*, *Plesiocaryon sp* y *Cyrtolophosis mucicola*; en el caso de los flagelados las especies dominantes fueron *Chlamydomonas sp* y *Bodo designis*. La proporción de especies dominantes y comunes aumento a 22%, y 32% respectivamente, y las especies raras disminuyeron a 46% (Fig. 3C).

En el SPC las especies con mayor frecuencia fueron los ciliados *Colpoda steinii*, *Plesyocarion elongatum* y *Colpoda cucullus*; el género *Colpoda* pasó de ser común en el SP a dominante en este suelo. Por parte de los flagelados los más dominantes fueron *Adriamonas sp*, *Bodo designis*, *Spumella dangeardii* y *Rynchomonas nasuta*. En este tratamiento la proporción de dominantes, comunes y raras fue 22, 35 y 43% respectivamente (Fig. 3D).

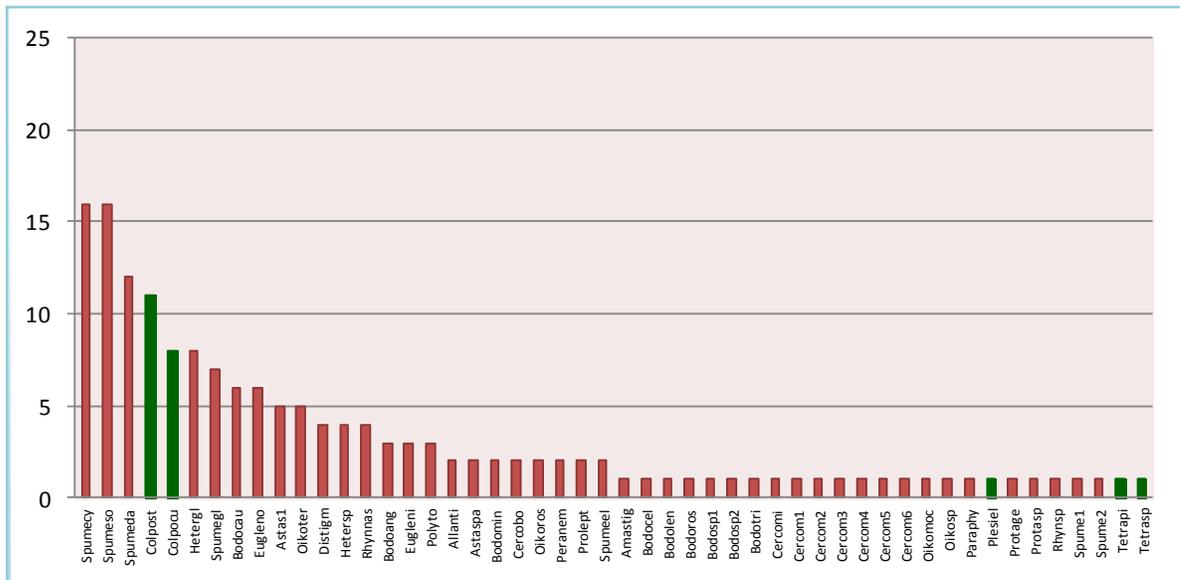
En los tratamientos con *Medicago sativa* hubo menos especies raras pero mayor cantidad de especies comunes y dominantes.

FRECUENCIA

S



SC



ESPECIES

Fig.3. Frecuencia acumulada por especies. S- Suelo control, SC-Suelo contaminado, SP-suelo con planta, SPC- suelo con planta contaminado. Barras rojas- flagelados, Barras verdes- ciliados.

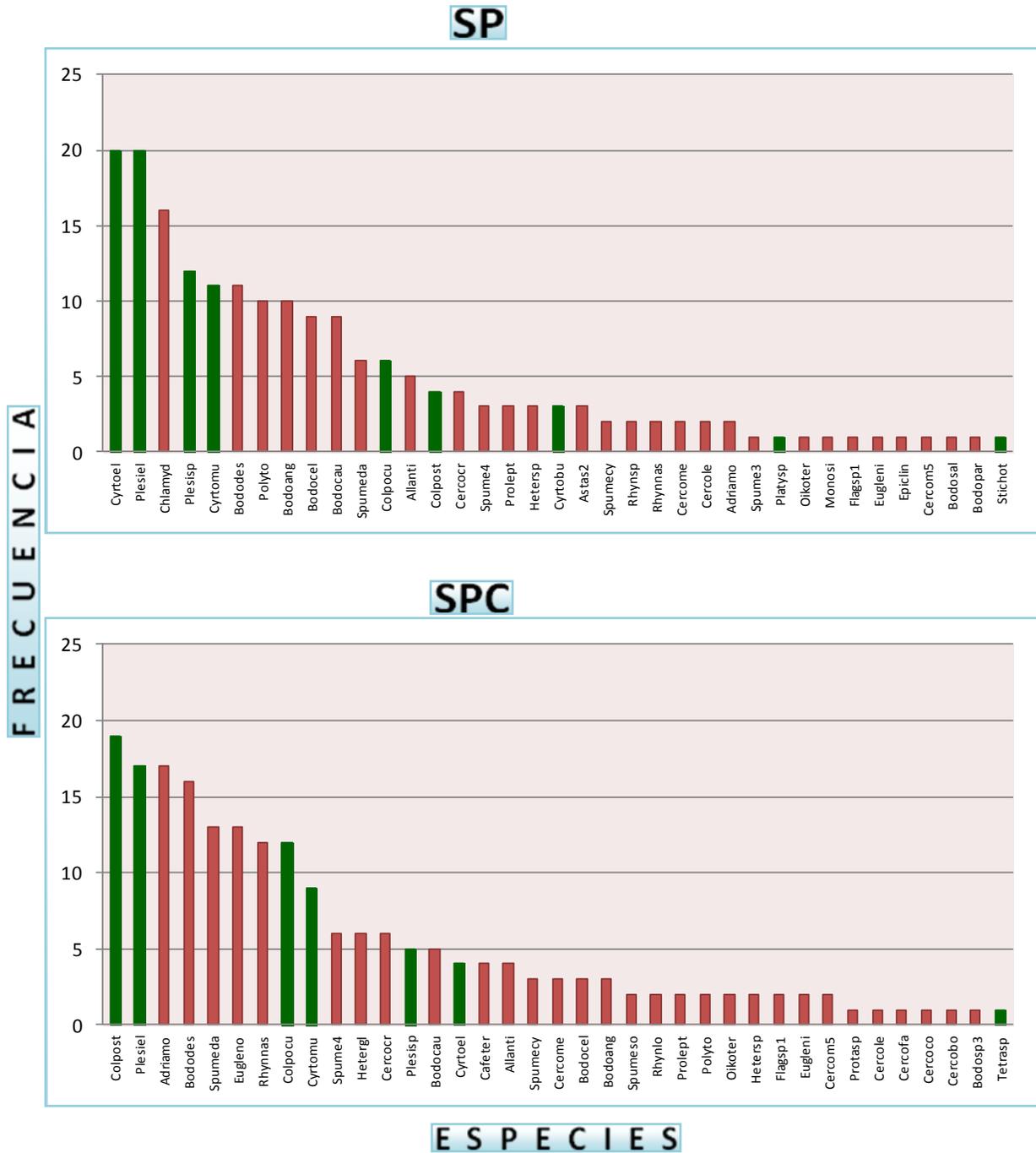


Fig.3. Frecuencia acumulada por especies. S- Suelo control, SC-Suelo contaminado, SP- suelo con planta, SPC- suelo con planta contaminado. Barras rojas- flagelados, Barras verdes- ciliados.

En los tratamientos con *Medicago sativa* la frecuencia de especies incrementó 109% en el SC y en el SPC 123% en comparación con el S (Fig. 4), estos resultados fueron estadísticamente significativos ( $Ji^2 p \leq 0.05$ ).

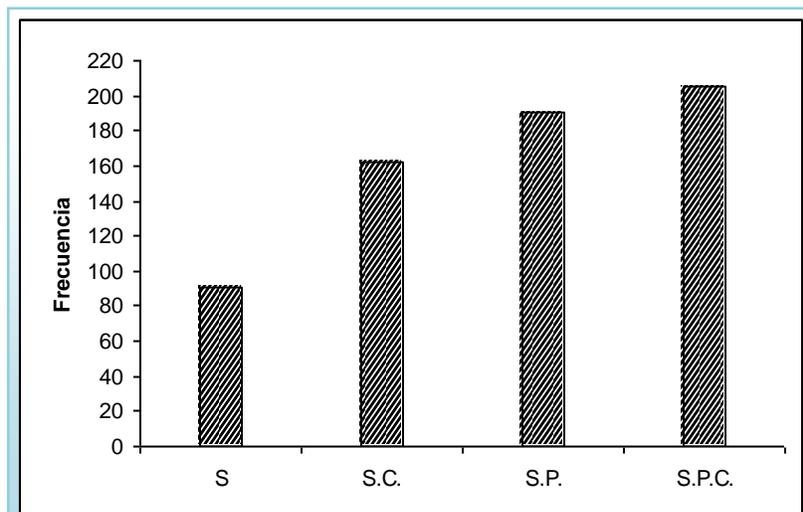


Fig. 4. Efecto de *Medicago sativa* en la frecuencia de especies de ciliados y flagelados.

## SIMILITUD ENTRE LA RIQUEZA DE ESPECIES

El análisis de similitud por presencia-ausencia de especies entre tratamientos formó dos grupos, los suelos con *Medicago sativa* forman un grupo que comparte 100% de información, y este grupo es 53% similar al SC. El suelo no control forma parte de este grupo (Fig. 5).

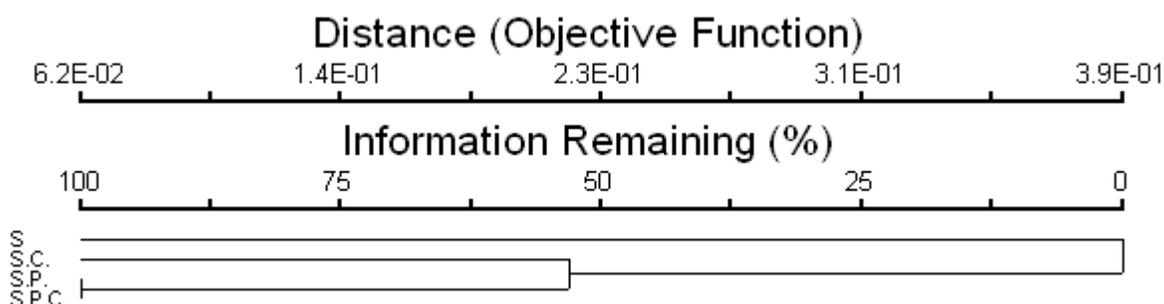


Fig. 5. Índice de similitud de todos los tratamientos S, SC, SP y SPC.

Analizando la similitud con base en la frecuencia de aparición de las especies en los periodos de muestreo (Fig. 6), se obtuvo la formación de un grupo que se parece el 76% que corresponde al SP y la formación del grupo del SPC que se parece en un 68%. El SC forma un grupo que se parece el 70%, solo los días 13,17, 21 y 25. y se forma otro grupo en los días 5, 9 y este no se parece a los demás grupos. El Suelo control forma 3 grupos pequeños que comparten poca información entre ellos.

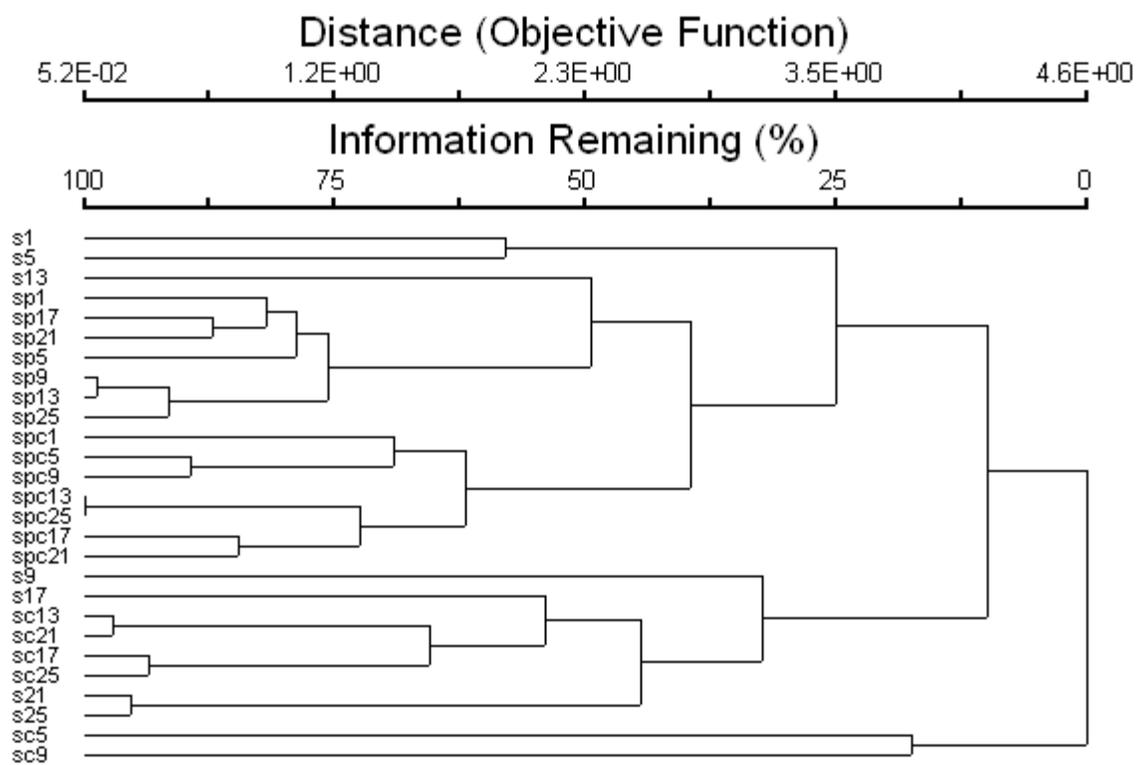


Fig. 6. Similitud tomando en cuenta las frecuencias de todos los tratamientos S, S.C., S.P. y S.P.C con los diferentes días (1, 5, 9, 13, 17, 21, 25) de muestreo.

## GRUPOS TRÓFICOS

Se identificaron 6 grupos tróficos en todos los tratamientos: Alguivoro-Bacterívoro, Bacterívoro, Eucariotrófico, Mixotrófico, Omnívoro y Osmotrófico (Fig. 7). La comunidad de ciliados y flagelados pertenecientes al grupo bacterívoro fue del 92%, Osmotrófico 3.5%, Alguivoro-Bacterívoro 0.5%, Eucariotrófico 0.5%, Mixotrófico 3% y Omnívoro 0.5%.

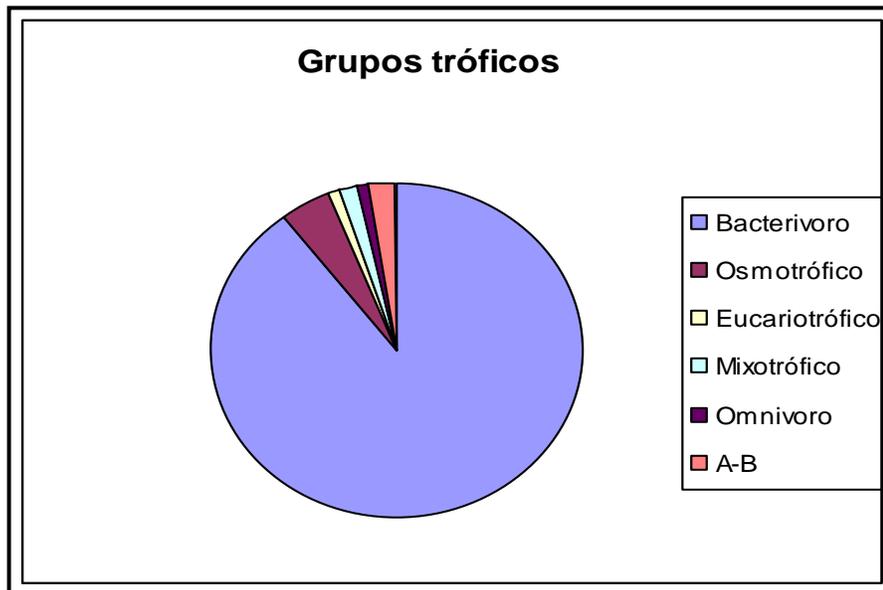


Fig. 7. Grupos tróficos de la comunidad de ciliados y flagelados total.

En el suelo control se encontraron 4 grupos tróficos: Bacterívoro, Eucariotrófico, Alguivoro-Bacterívoro y Omnívoro. Durante los días de muestreo se encontraron los 4 grupos tróficos, a partir del día 13 y hasta el día 25 solo se observó el grupo bacterívoro (Fig. 8A).

En el suelo con combustóleo se encontraron 2 grupos tróficos: bacterívoro y osmotrófico, este último solo se encontró en los días 5 y 9 (Fig. 8B).

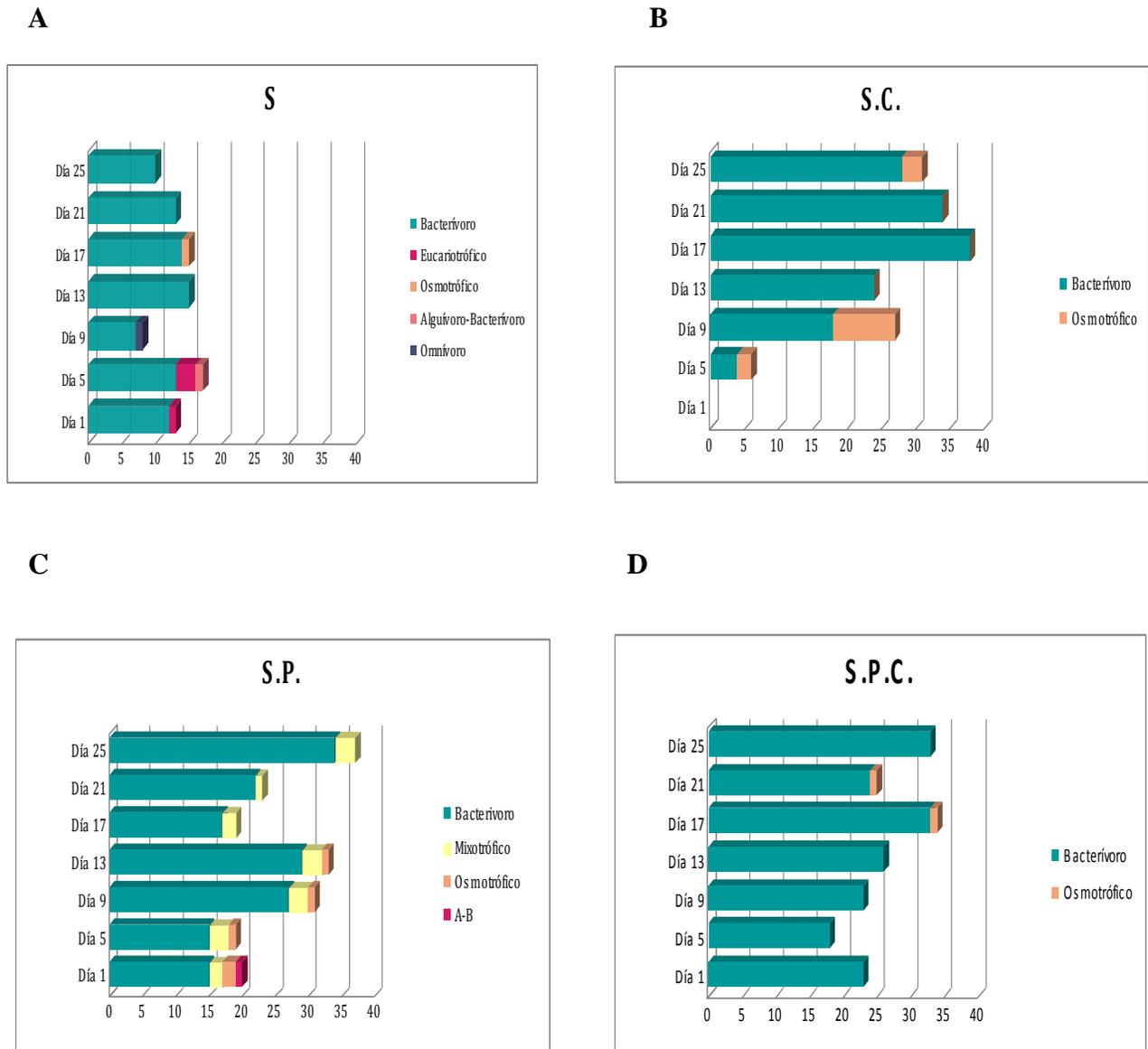


Fig. 8. Grupos tróficos de la comunidad de ciliados y flagelados en todos los periodos de muestreo. A- Suelo control, B-Suelo contaminado, C-Suelo con planta, D- suelo con planta contaminado.

En el suelo con planta encontramos 4 grupos tróficos, siendo los bacterívoros el grupo dominante, en este suelo se vio favorecido el grupo mixotrófico que está representado con la especie *Chlamydomonas sp*, la cual se encontró en todos los periodos de muestreo (Fig. 8C).

En el suelo con planta con combustóleo se encontraron dos grupos tróficos bacterívoro y osmotrófico (Fig. 8D), siendo los bacterívoros los más abundantes.

En el caso del tratamiento con hexano fue comparado con los demás tratamientos solos los días 1 y 25 (fig. 9). Se encontraron cuatro grupos tróficos; bacterívoro, mixotrófico, alguívoro-bacterívoro y osmotrófico (Fig. 9e). El grupo más abundante fue el bacterívoro.

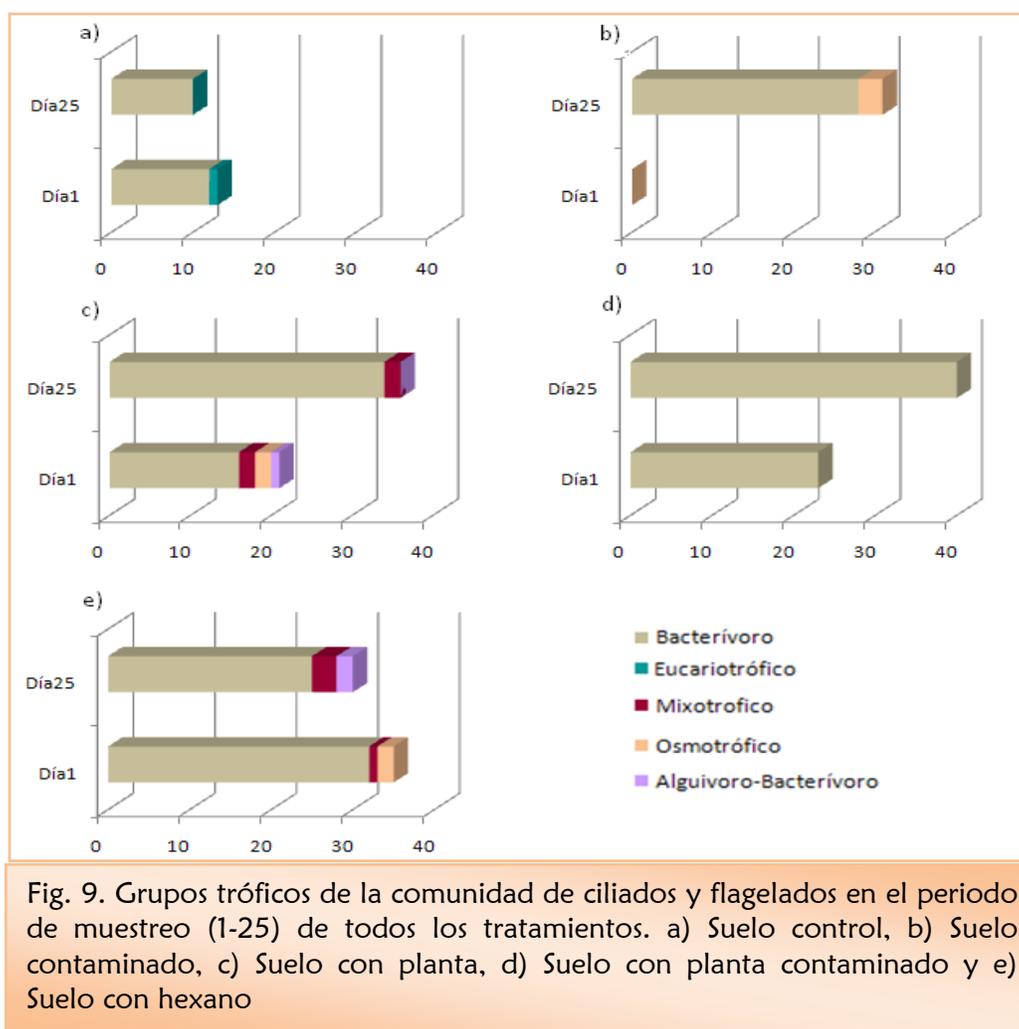


Fig. 9. Grupos tróficos de la comunidad de ciliados y flagelados en el periodo de muestreo (1-25) de todos los tratamientos. a) Suelo control, b) Suelo contaminado, c) Suelo con planta, d) Suelo con planta contaminado y e) Suelo con hexano

## SIMILITUD ENTRE GRUPOS TRÓFICOS

Por el contenido de especies, el grupo bacterívoro de todos los tratamientos forma dos grupos, los que tienen mayor parecido son los tratamientos con *Medicago sativa* (SP y SPC) que tienen una similitud del 90%, y los bacterívoros del S y SC tienen una similitud del 72%, estos dos grupos comparten el 50% de similitud. El grupo osmotrófico del SC y SPC tienen una similitud del 100% (Fig. 10).

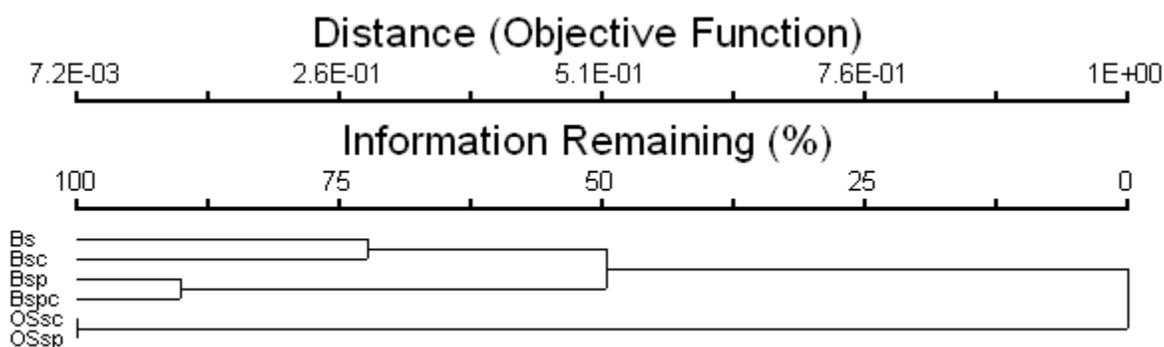
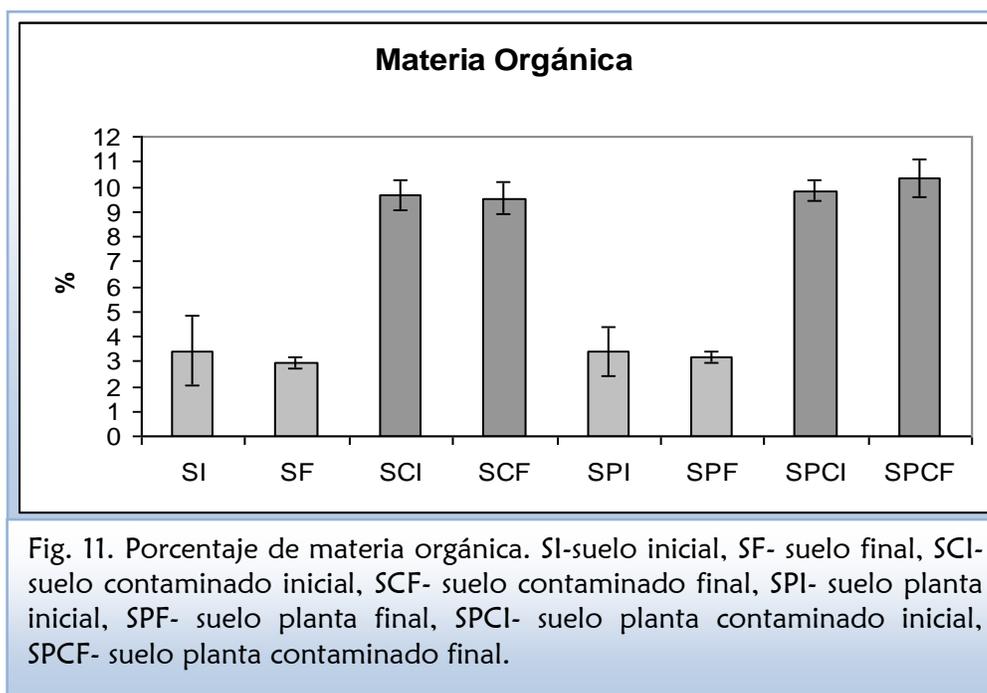


Fig. 10. Similitud de los grupos tróficos. Bs- bacterívoros del suelo control, Bsc- bacterívoros del suelo con combustóleo, Bsp- bacterívoros del suelo con planta, Bspc- bacterívoros del suelo con planta con combustóleo, OSsc- osmotróficos del suelo con combustóleo, OSsp- osmotróficos del suelo con planta con combustóleo.

## MATERIA ORGÁNICA

Los porcentajes de materia orgánica en el S y SP fueron medios y no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Mientras que la M.O. de los tratamientos SC y SPC fueron ricos, sin embargo no hay diferencia significativa entre ellos (Fig.11). En los tratamientos con combustóleo se incrementó el contenido de materia orgánica hasta 300%, este compuesto está conformado por productos con estructuras de C<sub>25</sub> a C<sub>35</sub> correspondientes a compuestos saturados, poliaromáticos y de cadena larga que son difíciles de oxidar en las condiciones del método Walkley-Black, por lo que solo una parte de sus componentes es de fácil oxidación, (Martínez y López, 2001), lo que indica que el combustóleo es el responsable directo del incremento de M.O. aunque su cuantificación esté subestimada.



## BIOMASA DE *Medicago sativa*

La biomasa de *Medicago sativa* fue mayor en el tratamiento SP. En los tratamientos iniciales (SPI y SPCI) la biomasa fue similar, en los tratamientos finales (SPF y SPCF) el tratamiento que no tiene combustóleo aumentó su biomasa 43%; y el tratamiento con combustóleo disminuyó su biomasa 12% (Fig. 12). Estos resultados son estadísticamente significativos. El combustóleo tuvo un efecto negativo en el crecimiento de *Medicago sativa*, por lo que las raíces en el tratamiento con combustóleo fueron más gruesas, el área foliar fue menor y el color de las hojas cambio de verde a amarillento.

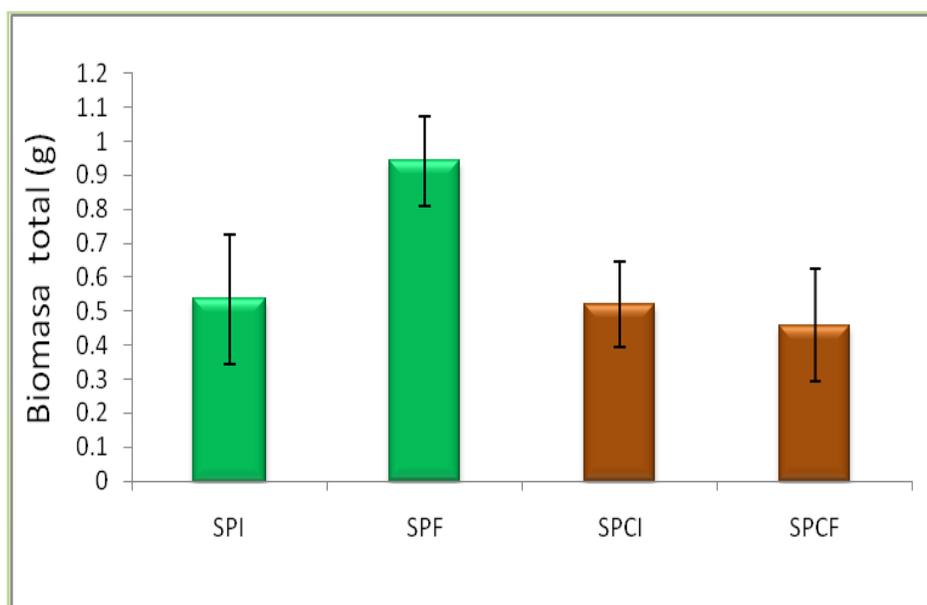


Fig. 12. Biomasa total de *Medicago sativa*. SPI- suelo planta inicial, SPF- suelo planta final, SPCI- suelo planta contaminado inicial, SPCF- suelo planta contaminado final.

## DISCUSIÓN

En todos los tratamientos se encontró mayor riqueza de especies de flagelados que de ciliados (Fig.2), esto coincide con otros trabajos que indican que en los suelos agrícolas se encuentran mayor riqueza de flagelados heterotrófos y amebas desnudas que de ciliados (Ekelund y Rønn, 1994); incluso ha habido estudios en suelos agrícolas en los que no ha detectado especie alguna de ciliados (Griffiths *et al.*, 2001).

Los géneros de flagelados con mayor riqueza de especies en nuestro experimento fueron *Bodo*, *Cercomonas*, *Spumella* y *Oikomonas*; lo que concuerda con lo reportado por Ekelund y Røn, (1994) quienes reportaron que los géneros de flagelados *Cercomonas* y *Bodo* son los más comunes en los suelos, junto con *Heteromita* los cuales forman frecuentemente el 50% o más de toda la biomasa de protozoos en el suelo (Lara *et al.*, 2007a); lo anterior concuerda también con otros estudios que se han hecho en suelos de pastizales y bosques (Tikhonenkov, *et al.*, 2010). Estas especies de flagelados tienen la capacidad de formar quistes rápidamente, lo que les ayuda a sobrevivir en las condiciones de falta de agua y alimento, pero pueden aprovechar rápidamente los pulsos de recursos en las ventanas de actividad del suelo.

El flagelado *Heteromita globosa* se encontró que es sujeto a selección *a* (adversa). Esta es una forma extrema de selección *r* que optimiza la utilización de los recursos durante periodos cortos de condiciones favorables (Foissner, 1991). Esta especie también ha sido aislada de suelos contaminados (Mattison y Harayama, 2001; Lara *et al.*, 2007a).

A los flagelados del género *Spumella* se les considera organismos ubicuos y distribuidos por todo el mundo, encontrándolos en diferentes ecosistemas, desde agua dulce, suelos, hasta aguas marinas y han sido registrados como dominantes en la mayoría de las muestras procesadas (Boenigk *et al.*, 2005)

Los ciliados del genero *Plesyocarion*, *Cyrtolophosis* y *Colpoda* fueron los más comunes, estos últimos son muy frecuentes en todos los suelos debido a que tienen una estrategia adaptativa especial en su ciclo de vida; la cual es conferida por su capacidad de enquistarse fácilmente cuando la humedad decrece, pero pueden recobrar su estado trófico si el suelo se humedece otra vez (Li, *et al.*, 2010).

Las perturbaciones pueden alterar la diversidad de un ecosistema, ya sea directa o indirectamente; en la forma directa afectan la supervivencia de los organismos y en la indirecta cambian los niveles de recursos (Neher, 1999). En este trabajo se encontró que la riqueza de especies y frecuencia de ciliados y flagelados del SC fue mayor en comparación con el S, esto puede ser debido a que el combustóleo representó un aporte de recursos extra y como los suelos de cultivo son perturbados constantemente (Neher, 2009), tienen su diversidad disminuida, aunque las especies que se encuentran en estos sitios ya están adecuadas a dichos cambios un aporte extra de recursos le permite a la comunidad de protozoos incrementar su riqueza de especies.

La contaminación por hidrocarburos tiene diferentes efectos en las comunidades microbianas, este efecto puede darse por varias vías; una de ellas es el aumento de la comunidad de microorganismos heterótrofos, en otros casos es el predominio de pocos géneros que pueden degradar los hidrocarburos, y en otros más las poblaciones heterotróficas se mantienen sin cambios (Leahy y Colwell, 1990). Todo esto dependerá de la naturaleza del contaminante, la estructura del suelo y su hidrogeología, el estado nutricional y la composición microbiana del lugar (Kuiper *et al.*, 2004 y Das y Chandran 2011). Particularmente, en el caso de las comunidades de protozoos el efecto de los hidrocarburos puede que les afecte directamente por la toxicidad del contaminante o indirectamente a través del efecto sobre su alimento (presas) (Lara *et al* 2007a).

En el SC se presentó una sucesión de la comunidad de ciliados y flagelados; en el 1er

día no se encontraron ciliados ni flagelados, solo bacterias y nanoflagelados; en el segundo día se empezó a establecer la comunidad de flagelados, algunas de las especies que se establecieron fueron *Astasia parvula*, *Astasia sp1* y *Distigma proteus*. Esta última es muy abundante en sitios con altas concentraciones de M.O. además, se conoce que tiene la capacidad de resistir a contaminaciones por metales pesados como el  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y, debido a esto se ha propuesto para formar parte del consorcio de microorganismos en la biorremediación de metales pesados en aguas residuales contaminadas (Rehman *et al*; 2006). En este estudio pudo ser que en el primer momento de contaminación *Distigma proteus* y *Astasia parvula* pudieran haberse alimentado de moléculas del combustóleo de fácil degradación (debido a que son osmotróficas (Sanders, 1991; Busse y Preisfeld, 2003)), pero conforme la comunidad de ciliados y flagelados se adaptan a la contaminación por combustóleo, otras especies de flagelados se fueron apropiando del espacio y de los recursos y desplazaron a las primeras. Cabe señalar que estas especies de flagelados solo se encontraron en el SC en los días 5 y 9.

Comparando la riqueza de especies de los diferentes tratamientos de S, SC, SP y SPC la mayor riqueza de especies la encontramos en el SC, pero con diferente frecuencia de especies, ya que éstas son más abundantes en los tratamientos con *Medicago sativa*. En otros trabajos como los de Lara *et al* (2007a y b) se encontró que en suelos contaminados hay más abundancia de especies pero menor riqueza de estas, por ello se dice que los hidrocarburos disminuyen la diversidad del sistema. Pero este patrón de disminución de la riqueza de especies en suelos contaminados no se observó en este trabajo.

En este estudio se encontró mayor riqueza de especies en el SC y también incrementó su frecuencia en un 76%, esto se debe a que las comunidades microbianas responden rápidamente a la adición de materia orgánica, además de que cada uno de los grupos responden diferencialmente a estas adiciones, dependiendo de sus requerimientos nutrimentales (Ekelund *et al.*, 2002; Lara *et al*,

2007a). Este incremento de la actividad microbiana en el SC se debe al carbono adicional proporcionado por el combustóleo, ya que incrementó el contenido de materia orgánica hasta 300% lo que facilita un mayor crecimiento bacteriano; esto es conocido como “efecto priming” que se debe a un cambio fuerte a corto plazo en la rotación de la materia orgánica del suelo, que puede ser inducida por la adición de compuestos o por la alteración del mismo (Marschner, 2007). El incremento de la riqueza de especies en el SC también pudo deberse a la sucesión de ciliados y flagelados (desde el día 1 al 25) causada por la contaminación por combustóleo, y está estuvo representada por grupos diferentes de flagelados y ciliados en cada muestreo, lo que incrementó la riqueza de especies.

En las fases de degradación del petróleo se ha observado que hay diferentes grupos bacterianos que son más dominantes que otros y esto cambia a lo largo del tiempo (sucesión bacteriana). Estos cambios sucesionales sugieren que la degradación inicial de contaminantes derivados del petróleo es mediada por la utilización microbiana de compuestos biodisponibles, gobernado por la fisiología microbiana (Nkwelang *et al.*, 2008). En este trabajo parece ser que la comunidad de protozoos también está sujeta a estos cambios ya que también se registró una sucesión en la comunidad de ciliados y flagelados.

En el SC aparecen ciliados del género *Colpoda* en los días 13, 17, 21 y 25, siendo en este periodo de tiempo el género con mayor frecuencia de aparición. Estos organismos tienen la capacidad de reducir la diversidad y abundancia de las bacterias en los sitios contaminados (Chen *et al.*, 2009).

La actividad de los “hots spots” en el suelo está sujeta a fluctuaciones de humedad y temperatura, produciendo condiciones de “pare y siga” a la que los Colpodidos están acostumbrados por su amplia tolerancia a condiciones extremas, su habilidad de rápido enquistamiento/ desenquistamiento, y su rápida multiplicación; además, de que puedan metabolizar incluso bajo malas condiciones ambientales mientras que otras especies están enquistadas. Los Colpodidos son los primeros colonizadores

o también llamados estrategias “r” de los suelos, seguidos por los seleccionadores intermedios y las especies K (Bamforth, 2001), por tanto son más resistentes por eso son tan comunes en los suelos. Además, se aprovechan del recurso cuando no hay competencia por otros ciliados y por tanto se ven favorecidas sus comunidades bajo condiciones de estrés como es el caso de la contaminación por combustóleo.

Se considera que si la perturbación es común o tiene un largo periodo de duración, sólo unos pocos grupos de organismos resistentes se mantendrán. Si el trastorno es leve o poco frecuente en las comunidades del suelo habrá equilibrio y serán dominados por pocos grupos que pueden excluir a todos los demás (Neher, 2010), además de que las perturbaciones cambian la dominancia de las especies como ocurrió con las especies del género *Colpoda* que pasaron de ser raras y comunes a dominantes en los dos tratamientos con combustóleo SC y SPC respectivamente (Fig. 3).

En los ecosistemas hay pocas especies que son dominantes, otro porcentaje son comunes y la mayoría son raras, las perturbaciones pueden cambiar la dominancia de especies, y la estructura de las comunidades. En este trabajo hubo un cambio en la dominancia de especies en los SC, SP y SPC, esto con respecto al S, incrementando el porcentaje especies dominantes y comunes, y disminuyendo la cantidad de especies raras (Fig. 3). Se sabe que las especies raras son funcionalmente similares a las especies dominantes pero con diferentes requerimientos y tolerancias ambientales, lo que las favorece sobre las especies dominantes cuando las condiciones ambientales cambian. Por lo que estas especies incrementan la resiliencia en el funcionamiento de ecosistemas perturbados (Lyons *et al.*, 2005).

En suelos contaminados las plantas tienen un efecto benéfico sobre la población de los microorganismos degradadores de contaminantes. La eficacia de tratamientos del suelo con las plantas está determinada no sólo por el número de microorganismos degradadores de contaminantes en la rizósfera, también por la actividad de las

enzimas biodegradadoras producidas por estos microorganismos (Muratova *et al.*, 2003a).

La rizósfera tiene un efecto seleccionador en la composición de la comunidad de microorganismos que están asociados a ella, debido a los procesos que en ella se desarrollan como son la movilización de nutrientes, exudados y descomposición de la materia orgánica (Cheng *et al.*, 2009; Kuiper *et al.*, 2004; Xiaoyun *et al.*, 2007).

Un efecto claro que tiene la rizósfera sobre los microorganismos del suelo es el incremento de la actividad microbiana (Bonkowski, 2004, Xiaoyun *et al.*, 2007), incluso los exudados de las raíces pueden incrementar la actividad del 25 a 50% (Griffits, 1994, Kuiper 2004). En este trabajo las raíces de *Medicago sativa* tuvieron una influencia en la estructura de la comunidad en varios aspectos; uno es que incrementó la frecuencia de especies que conforman la comunidad de ciliados y flagelados, esto ocurrió en los dos tratamientos con *M. sativa* (SP y SPC); otro efecto fue la selección en la comunidad de ciliados, pues en ambos tratamientos con planta se incrementa la comunidad de estos protozoos. Esto se debe a que las plantas tienen un efecto crucial en la composición de la comunidad microbiana, ya que la cantidad y la composición de los exudados de las raíces dependerán de la especie de planta, por lo que la comunidad microbiana asociada a la rizósfera dependerá de las condiciones que genera la planta (Xiaoyun *et al.*, 2007).

Los beneficios de las plantas en la mineralización de los nutrientes, se da como resultado del incremento de las interacciones entre bacterias y protozoos alrededor de las raíces (Clarholm, 1989). Por ejemplo los exudados de la raíz de alfalfa son ricos en ácidos orgánicos y nitrógeno, los cuales puede promover el crecimiento de microorganismos del suelo (Muratova *et al.*, 2003a), en este trabajo las interacciones que se favorecen por el establecimiento de la planta se reflejan en la homogenización de la comunidad de ciliados y flagelados, ya que en los tratamientos SP y SPC son muy similares en cuanto a riqueza de especies por lo que comparten el 100% de la información en nuestro análisis de similitud (Fig. 5). En el



análisis de similitud de todos los días que duró el experimento (1-25) en el que se observa cómo las comunidades de ciliados y flagelados se agrupan en una misma región del dendrograma, comparándolas con el S y SC, lo que refuerza esta interpretación del efecto de *M. sativa* sobre la comunidad de ciliados y flagelados.

El incremento de la actividad de los microorganismos en este trabajo también se manifestó en la frecuencia de las especies de ciliados y flagelados ya que ésta aumentó considerablemente en comparación con el suelo control (Fig. 4). En el SP y SPC el incremento fue de 109% y 123% respectivamente lo que fue estadísticamente significativo ( $Ji^2 p \leq 0.05$ ), en otros trabajos se ha encontrado que el incremento de protozoos en la rizósfera ha sido de 1.3 veces (Zwart *et al.*, 1994), pero esto dependerá del tipo de planta que se esté analizando.

En este trabajo el combustóleo no afectó el establecimiento de *M. sativa* pero sí su desarrollo y su apariencia, lo que influyó en la disminución de la biomasa total al final del experimento (Fig. 11) esto fue estadísticamente significativo; además de que las raíces de *M. sativa* fueron más gruesas y el área foliar fue menor. A pesar de la disminución en el crecimiento de *M. sativa* la frecuencia de especies de ciliados y flagelados se incrementó en comparación con el suelo control, incluso la frecuencia de especies fue mayor comparándolo con el SP, esto también se debió al incremento en la materia orgánica. En otros trabajos se ha encontrado que los hidrocarburos policíclicos aromáticos tienen un efecto negativo en la germinación de las plantas, en el estudio de Smith *et al* (2006) se probó el efecto de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en siete leguminosas y gramíneas, en el cual, las plantas se vieron afectadas en su germinación y en el peso de las mismas.

Las interacciones que se están llevando a cabo entre la planta y los microorganismos ayudan al desarrollo de la sucesión de protozoos, en este caso la planta está teniendo un efecto positivo en esta comunidad. En otros trabajos se ha encontrado que el comportamiento de la comunidad microbiana depende del estado de

desarrollo de la planta y el petróleo reduce el desempeño de la misma (Nie et al., 2011 y Xiaoyun et al., 2007). Sin embargo, estas interacciones planta-microorganismos ayudan a un rápido desarrollo sucesional, lo que llevaría a aumentar la velocidad de degradación de los contaminantes. Gurska et al., 2009 trabajaron con la fitorremediación de hidrocarburos utilizando el centeno y la comunidad de rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas. Encontraron que la tasa de degradación del contaminante fue de 61.5% en 3 años. En otro trabajo como el de Phillips et al., 2009 que trabajo con trigo, centeno y alfalfa en donde encontraron que la concentración hidrocarburos totales del petróleo se redujo 50% en 4.5 meses.

Los cambios en la estructura de la comunidad se reflejan también en cambios en las redes tróficas (Pratt y Cairns, 1985). Los cambios que sucedieron en la comunidad de ciliados y flagelados en los diferentes tratamientos modificaron la estructura de los grupos tróficos de estos protozoos. En otros estudios que se han hecho con *Medicago sativa* y *Phragmites australis* en suelos contaminados por hidrocarburos (hidrocarburos poliaromáticos y asfalto) se encontró una disminución en el número total de los microorganismos del suelo y un incremento en la cantidad de bacterias degradadores de hidrocarburos (Muratova et al., 2003 a y b). Por lo que en este trabajo podemos establecer que la dominancia del grupo bacterívoro en el SC y SPC apoya fuertemente la hipótesis de una mayor presencia de diferentes especies bacterianas degradadoras de hidrocarburos.

El efecto de *M. sativa* se observa en el incremento de la frecuencia de especies y en la selección de la comunidad de ciliados y flagelados. Sin embargo en el periodo de estudio no se observó una recomposición de los grupos tróficos similar a la que presentan los suelos sin combustóleo, pero esta recomposición podría darse en un mayor lapso de tiempo.

## CONCLUSIÓN

El combustóleo tiene un efecto negativo en la estructuración de los grupos tróficos de ciliados y flagelados ya que simplifica las redes tróficas del suelo. Por otro lado se observó un incremento en la abundancia del grupo bacterívoro en los tratamientos con combustóleo, lo cual es un indicador que la comunidad de protozoos se está alimentando de bacterias tolerantes y degradadoras de hidrocarburos.

La presencia de *Medicago sativa* tuvo una influencia positiva sobre la comunidad de ciliados y flagelados, incrementando su abundancia; pero en este periodo no se observó un efecto en el restablecimiento de los grupos tróficos. Estas interacciones que se desarrollan entre planta-microorganismos podrían utilizarse para acelerar la remediación de suelos contaminados.

## REFERENCIAS

- Bamforth, S. 1992. Sampling enumerating soil protozoa. En: *Protocols in protozoology*. (eds) Lee J. y A. Soldo. Allen Press, INC. Kansas, EUA. Pág. B-5.1- B-5.3.
- Bamforth, S. 2001. Proportions of active ciliate taxa in soils. *Biology and Fertility of Soils* 33:197–203.
- Boenigk, J., K. Pfandl, P. Stadler y A. Chatzinotas. 2005. High diversity of the “Spumella-like” flagellates: An investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environmental Microbiology* 7: 685–697.
- Bonkowski, M. y F. Brandt. 2002. Do soil protozoa enhance plant growth by hormonal effects? *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1709–1715.
- Bonkowski, M. 2004. Soil protozoa and plant growth - the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* 162: 617-631.
- Busse, I. y A. Preisfeld. 2003. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia* (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 617–624.
- Chen, Q., N. Tam, P. Shin, S. Cheung y R. Xu. 2009. Ciliate communities in a constructed mangrove wetland for wastewater treatment. *Marine Pollution Bulletin* 58: 711–719.
- Clarholm, M. 1989. Effects of plant-bacterial-amoebal interactions on plant uptake of nitrogen under field conditions. *Biology and Fertility of Soils* 8:373-378.
- Das, N. y P. Chandran. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International* doi:10.4061/2011/941810.

- Del Paño, M., I. Morelli, B. Encelen y L. Berthe-Corti. 2005. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology* 53: 305-316.
- Ekelund, F y R. Rønn. 1994. Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 321-353.
- Ekelund, F., H. Frederiksen y R. Rønn. 2002. Population dynamics of active and total ciliate populations in arable soil amended with wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1096-1101.
- Enciclopedia de los Municipios de México. Centro Nacional de Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Veracruz. 2000. Disponible en: <http://www.emexico.gob.mx/work/EMM04/Veracruz/index.html>
- Ferrera-Cerrato R., A. Alarcon, M. Mendoza-Lopez, W. Sangabriel, D. Trejo-Aguilar, J. Cruz-Sanchez, C. Lopez-Ortiz, y J. Delgadillo-Martinez. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41(8):817-826.
- Foissner, W. 1991. Diversity and ecology of soil flagellates. Pp.93-112 in Patterson D. y Larsen J. (eds) *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. The Systematics Association, Oxford. 505 pp.
- Girvan, M., C. Campbell, K. Killham, J. Prosser y L. Glover. 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology* 7(3): 301–313.
- Griffiths, B. 1994. Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: Their effects on microbial activity and nitrogen



mineralization in decomposition hotspots and the rhizosphere. *Plant and Soil* 164: 25-33.

- Griffiths, B., M. Bonkowski, J. Roy y K. Ritz. 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16: 49–61.
- Gurska, J., W. Wang, K. Gerhardt, A. Khalid, D. Isherwood, X. Huang, B. Glick y B. Greenberg. 2009. Three year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste. *Environmental Science y Technology*. 43(12):4472-4479.
- Joner, E y C. Leyval. 2003. Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environmental Science and Technology* 37: 2371-2375.
- Karpov, S., E. Flemming y Ø. Moestrup. 2003. *Katabia gromovi* nov.gen., nov. sp. – a new soil flagellate with affinities to *Heteromita* (Cercomonadida). *Protistology* 3(1): 30-41.
- Kuikman, P., A. Jansen, J. van Veen, y A. Zehnder. 1990. Protozoan predation and the turnover of soil organic carbon and nitrogen in the presence of plants. *Biology and Fertility of Soils* 10:22-28.
- Kuiper, I., E. Legendijk, G. Bloemberg y B. Lugtenberg. 2004. Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(1): 6-15.
- Labud V., C. Garcia y T. Hernandez. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66: 1863–1871.
- Lara, E., C. Berney, F. Ekelund, H. Harms y A. Chatzinotas. 2007a. Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology and Biochemistry* 39:139-148.

- Lara, E., C. Berney, H. Harms y A. Chatzinotas. 2007b. Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 62: 365–373.
- Leahy, J. y R. Colwell, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54: 305-315.
- Lee, J., G. Leedale y P. Bradbury. 2000. The Illustrated Guide to the Protozoa. Allen Pres. INC., Laurence. USA. Ed: 2da. Vol. 1 (1-689) y Vol. 2 (690-1432) pp.
- Li, J. M. Li, J. Yang, Y. Ai y R. Xu. 2010. Community characteristics of soil ciliates at Baiyun Mountain, Guangzhou, China. *Zoological Studies* 49(6): 713-723.
- Lyons, K., C. Brigham, B. Traut y M. Schwartz. 2005. Rare Species and Ecosystem Functioning. *Conservation Biology* 19(4): 1019-1024.
- Margesin, R., F. Schinner y T. Zaos. 2005. Manual of soil analysis monitoring and assessing soil bioremediation. Springer. 366 pp.
- Marschner, P. 2007. Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere and Nutrient Cycling. Pp. 159-181 In : Marschner, P. y Z. Rengel (Eds.) *Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems (Soil Biology)*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 397 pp.
- Martínez, V. y F. López. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *TERRA Latinoamericana* 19(001): 9-17.
- Mattison, R. y S. Haramaya. 2001. The predatory soil flagellate *Heteromita globosa* stimulates toluene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters* 194: 39-45.
- McCune, B. y M. Mefford. 1999. PC-ORD. Multivariate analysis

of ecological data, Version 4. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, USA.

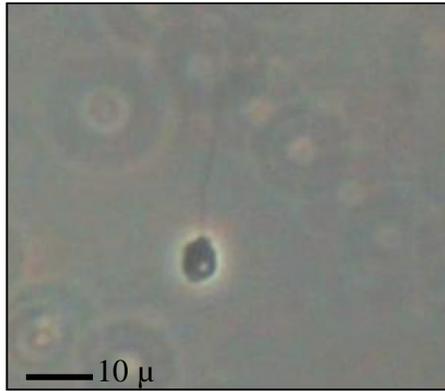
- Mondragón-Camarillo, L. 2007. Efecto del combustóleo sobre la comunidad de ciliados y flagelados de un suelo de cultivo en Jalacingo, Ver. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Pp. 59.
- Muratova, A., T. Hübner, S. Tischer, O. Turkovskaya, M. Möder y P. Kuschk. 2003a. Plant-Rhizosphere-Microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 5(2): 137–151.
- Muratova, A., T. Hübner, N. Narula, H. Wand, O. Turkovskaya, P. Kuschk, R. Jahn y W. Merbach. 2003b. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Research in Microbiology* 158: 151-161.
- Myl'nikov, A. y S. Karpov. 2004. Review of diversity and taxonomy of cercomonads. *Protistology* 3(4): 201-217.
- Neher, D. 1999. Soil community composition and ecosystem processes Comparing agricultural ecosystems with natural ecosystems. *Agroforestry Systems* 45: 159-185.
- Neher, D. 2010. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural Soil. *The Annual Review of Phytopathology* 48:371-94.
- Nie, M., Y. Wang, J. Yu, M. Xiao, L. Jiang. 2011. Understanding Plant-Microbe Interactions for Phytoremediation of Petroleum-Polluted Soil. *PLoS ONE* 6(3): e17961. doi:10.1371/journal.pone.001796.
- Nkwelang, G. H. Kamga, G. Nkeng y S. Antai. 2008. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical soil polluted with oily sludge. *African Journal of Biotechnology* 7(8): 1075–1080.

- Ortíz, O., I. Lema y A. Gavilán. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta ecológica* 69: 83-92.
- Patterson, D. 1996. Free-Living Freshwater Protozoa. University of New south Wales Press Ltd, Sydney. 223 pp.
- Phillips, L., C. Greer y J. Germida. 2006. Culture-based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatments on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil. *Soil Biology y Biochemistry* 38 (9): 2823-2833.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology* 56:15–39.
- Pratt, J. y J. Cairns. 1985. Functional Groups in the Protozoa: Roles in Differing Ecosystem. *Journal of Protozoology* 32(3): 415-423.
- Rehman, A., F. Shakoori, A. R. Shakoori. 2006. Heavy metal resistant *Distigma proteus* (Euglenophyta) isolated from industrial effluents and its possible role in bioremediation of contaminated wastewaters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:753-758.
- Rivera-Cruz, M., R. Ferrera-Cerrato, V. Volke, R. Vázquez y L. Fernández. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra* 20: 423-434.
- Rogerson, A. y J. Berger. 1983. Enhancement of the microbial degradation of crude oil by the ciliate *Colpidium colpoda*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 29: 41–50.
- Rutherford, P. y N. Juma. 1992. Influence of soil texture on protozoa-induced mineralization of bacterial carbon and nitrogen. *Canadian Journal of Soil Science* 72: 183-200.

- Sander, R. 1991. Trophic strategies among heterotrophic flagellates. Pp. 21-38 In: Patterson, D. y J. Larsen (Eds.) *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. Oxford University Press, New York 505 pp.
- Sangabriel, W., R. Ferrera-Cerrato, D. Trejo, M. Mendoza, S. Cruz, C. López, J. Delgadillo y A. Alarcón. 2006. Tolerancia y capacidad de Fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista internacional de contaminación ambiental* 22(002): 63-73.
- Sarmiento, M., E. Ortiz y J. Álvarez. 2003. Emergencias ambientales asociadas a sustancias químicas en México. *Gaceta ecológica* 66: 54-63.
- Smith, M., T. Flowers, H. Duncan y J. Alder. 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution* 141: 519-525.
- Stoeck, T. y V. Edgcomb. 2010. Role of protists in microbial interactions with hydrocarbons. En: Timmis K. N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4\_178.
- Tang J., X. Niu, Q. Sun y R. Wang. 2010. Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms. *Journal of Environmental Technology and Engineering* 3(2):80-86.
- Tikhonenkov, D., Y. Mazei y E. Embulaeva. 2010. Effect of ecosystem type on soil heterotrophic flagellate communities under forest-steppe conditions. *Protistology* 6 (3): 188-203.
- Xiaoyun, C., L. Manqiang, H. Feng, M. Xiaofang, L. Huixin. 2007. Contributions of soil micro-fauna (protozoa and nematodes) to rhizosphere ecological functions. *Acta Ecologica Sinica* 27(8): 3132-3143.

- Zwart, K., P. Kuikman, J. van Veen. 1994. Rhizosphere protozoa: their significance in nutrient dynamics. En: Darbyshire J. F. ed., *Soil Protozoa*. Wallingford: CAB International, 93 –122.

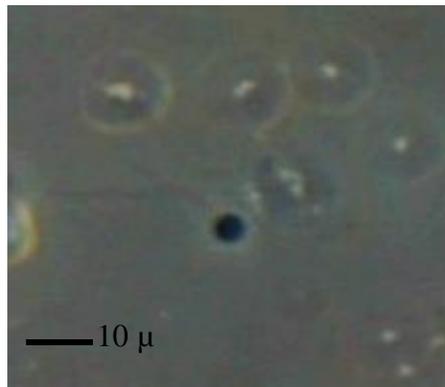
**ANEXO 1**



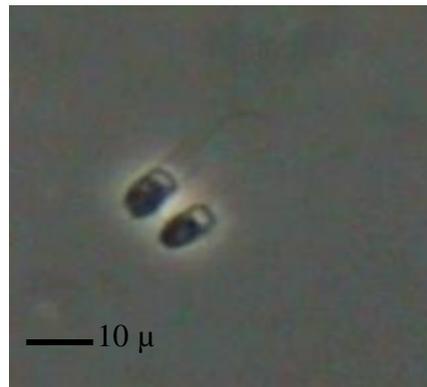
*Proleptomonas sp*



*Rynchomonas nasuta*



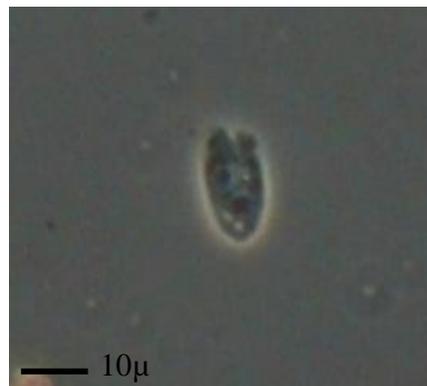
*Proleptomonas sp*



*Monosiga sp*



*Distigma proteus*



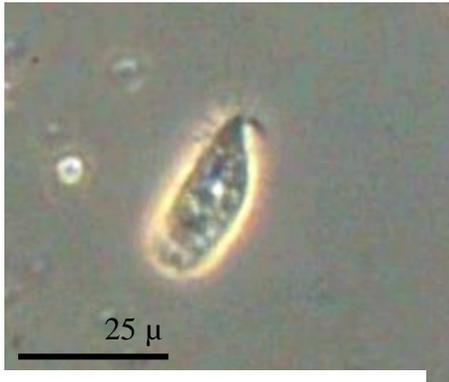
*Distigma proteus* (Anafase)



*Colpoda steinii*



*Colpoda cucullus*



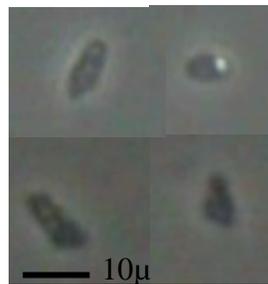
*Cyrtolophosis elongata*



*Plesyocarion elongata*



*Spumella socialis*



*Spumella cylindrica*

## ANEXO 2

### Ji- CUADRADA

Se tomaron los valores de la frecuencia acumulada de especies de los 4 tratamientos SC, SP, SPC y S. Se observaron diferencias significativas entre las frecuencias de especies con  $P < 0.05$ .

$$X^2 = \sum_{N=1}^H \sum_{N=1}^K \frac{(fo - fe)^2}{fe}$$

Donde:  
 $X^2$  = valor estadístico de ji cuadrada.  
 $fo$  = frecuencia observada.  
 $fe$  = frecuencia esperada.

	S	S.C	S.P	SPC	Totales por fila
Dia 1	13	0	21	23	57
Dia 5	17	7	21	18	63
Dia 9	8	27	32	24	91
Dia 13	15	25	36	29	105
Dia 17	15	38	20	36	109
Dia 21	13	34	24	33	104
Dia 25	10	31	37	42	120
Totales por columna	91	162	191	205	

### ANEXO 3

Frecuencia de especies de los 4 tratamientos SC, SP, SPC, S.

<b>S</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Frecuencia</b>
Actinomonas mirabilis	Actinom	1
Adriamonas sp	Adriamo	2
Blepharisma sp	Blephar	4
Bodo caudatus	Bodocau	9
Bodo designis	Bododes	1
Bodo minimus	Bodomin	4
Bodo ovatus	Bodoova	1
Cafeteria sp	Cafeter	1
Colpoda cucullus	Colpocu	2
Cyclidium glaucoma	Cyclidi	1
Cyrtolophosis elongata	Cyrtoel	2
Cyrtolophosis mucicola	Cyrtomu	7
Dimastigella sp	Dimasti	1
Drepanomonas dentata	Drepano	1
Epiclintes sp	Epiclin	1
Heteromita globosa	Hetergl	1
Heteromita sp	Hetersp	1
Homalozoon sp	Homaloz	1
Metopus sp	Metopus	1
Oikomonas mutabilis	Oikomut	1
Oikomonas steinni	Oikoste	1
Oikomonas termo	Oikoter	1
Paraphysomonas sp	Paraphy	1
Platyophrya sp	Platysp	1
Plesiocaryon elongatum	Plesiel	4
Polytoma sp	Polyto	1
Protaspis gemmifera	Protage	1
Rhynchobodo sp	Rhynsp	1
Spumella cylindrica	Spumecy	7
Spumella dangeardii	Spumeda	15
Spumella elongata	Spumeel	1
Spumella globulus	Spumegl	1
Spumella sociales	Spumeso	6
Tachysoma sp	Tachyso	1
Tetrahymena sp	Tetrasp	3
Uroleptus sp	Urolept	1
Urotricha sp	Urotric	2

<b>SC</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Frecuencia</b>
Allantion sp	Allanti	2
Amastigomonas sp	Amastig	1

Astasia sp1	Astas1	5
Astasia parvula	Astaspa	2
Bodo angustus	Bodoang	3
Bodo caudatus	Bodocau	6
Bodo celer	Bodocel	1
Bodo lens	Bodolen	1
Bodo minimus	Bodomin	2
Bodo rostratus	Bodoros	1
Bodo sp1	Bodosp1	1
Bodo sp2	Bodosp2	1
Bodo triangularis	Bodotri	1
Cercomonas bodo	Cercobo	2
Cercomonas sp1	Cercom1	1
Cercomonas sp2	Cercom2	1
Cercomonas sp3	Cercom3	1
Cercomonas sp4	Cercom4	1
Cercomonas sp5	Cercom5	1
Cercomonas sp6	Cercom6	1
Cercomonas minimus	Cercomi	1
Colpoda cucullus	Colpocu	8
Colpoda steinii	Colpost	11
Distigma proteus	Distigm	4
Euglenido	Eugleni	3
Euglenopsis sp	Eugleno	6
Heteromita globosa	Hetergl	8
Heteromita sp	Hetersp	4
Oikomonas ocellata	Oikomoc	1
Oikomonas rostratum	Oikoros	2
Oikomonas sp	Oikosp	1
Oikomonas termo	Oikoter	5
Paraphysomonas sp	Paraphy	1
Peranema sp	Peranem	2
Plesiocaryon elongatum	Plesiel	1
Polytoma sp	Polyto	3
Proleptomonas sp	Prolept	2
Protaspis gemmifera	Protage	1
Protaspis sp	Protasp	1
Rhynchomonas nasuta	Rhynnas	4
Rhynchobodo sp	Rhynsp	1
Spumella sp 1	Spume1	1
Spumella sp2	Spume2	1
Spumella cylindrica	Spumecy	16
Spumella dangeardii	Spumeda	12
Spumella elongata	Spumeel	2
Spumella globulus	Spumegl	7
Spumella sociales	Spumeso	16
Tethahymena piriformis	Tetrapi	1
Tetrahymena sp	Tetrasp	1

<b>SP</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Frecuencia</b>
Adriamonas sp	Adriamo	2
Allantion sp	Allanti	5
Astasia sp2	Astas2	3
Bodo angustus	Bodoang	10
Bodo caudatus	Bodocau	9
Bodo celer	Bodocel	9
Bodo designis	Bododes	11
Bodo parvus	Bodopar	1
Bodo saltans	Bodosal	1
Cercomonas crassicauda	Cercocr	4
Cercomonas lenta	Cercole	2
Cercomonas sp5	Cercom5	1
Cercomonas metabolicus	Cercome	2
Chlamydomonas sp	Chlamyd	16
Colpoda cucullus	Colpocu	6
Colpoda steinii	Colpost	4
Cyrtolophosis bursaria	Cyrtobu	3
Cyrtolophosis elongata	Cyrtoel	20
Cyrtolophosis mucicola	Cyrtomu	11
Epiclintes sp	Epiclin	1
Euglenido	Eugleni	1
Flagelado sp1	Flagsp1	1
Heteromita sp	Hetersp	3
Monosiga ovata	Monosiga sp	1
Oikomonas termo	Oikoter	1
Platyophrya sp	Platysp	1
Plesiocaryon elongatum	Plesiel	20
Plesiocaryon sp	Plesisp	12
Polytoma sp	Polyto	10
Proleptomonas sp	Prolept	3
Rhynchomonas nasuta	Rhynnas	2
Rhynchobodo sp	Rhynsp	2
Spumella sp3	Spume3	1
Spumella sp4	Spume4	3
Spumella cylindrica	Spumecy	2
Spumella dangeardii	Spumeda	6
Stichotricha sp	Stichot	1

<b>SPC</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Frecuencia</b>
Adriamonas sp	Adriamo	17
Allantion sp	Allanti	4
Bodo angustus	Bodoang	3
Bodo caudatus	Bodocau	5
Bodo celer	Bodocel	3

Bodo designis	Bododes	16
Bodo sp3	Bodosp3	1
Cafeteria sp	Cafeter	4
Cercomonas bodo	Cercobo	1
Cercomonas cometa	Cercoco	1
Cercomonas crassicauda	Cercocr	6
Cercomonas fatiga	Cercofa	1
Cercomonas lenta	Cercole	1
Cercomonas sp5	Cercom5	2
Cercomonas metabolicus	Cercome	3
Colpoda cucullus	Colpocu	12
Colpoda steinii	Colpost	19
Cyrtolophosis elongata	Cyrtoel	4
Cyrtolophosis mucicola	Cyrtomu	9
Euglenido	Eugleni	2
Euglenopsis sp	Eugleno	13
Flagelado sp1	Flagsp1	2
Heteromita globosa	Hetergl	6
Heteromita sp	Hetersp	2
Oikomonas termo	Oikoter	2
Plesiocaryon elongatum	Plesiel	17
Plesiocaryon sp	Plesisp	5
Polytoma sp	Polyto	2
Proleptomonas sp	Prolept	2
Protaspis sp	Protasp	1
Rhynchobodo longiciliatus	Rhynlo	2
Rhynchomonas nasuta	Rhynnas	12
Spumella sp4	Spume4	6
Spumella cylindrica	Spumecy	3
Spumella dangeardii	Spumeda	13
Spumella sociales	Spumeso	2
Tetrahymena sp	Tetrasp	1